

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Dpto. de NUTRICION Y BROMATOLOGIA II

**APLICACION DEL DIOXIDO DE CARBONO  
SUPERCRITICO AL PROCESADO DE  
ALIMENTOS: NATA, SUBPRODUCTOS DEL  
REFINADO DE ACEITES VEGETALES Y ZUMO  
DE NARANJA**

Ponente: Sr. Dr. M<sup>c</sup> Teresa Ojea Villanueva

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr. Espinauro Torije Itaso

Vocal: Sr. Dr. Fco Javier Lopez Andreu

Vocal: Sr. Dr. Marta Herrera Cera

Vocal: Sr. Dr. Nieves Corra Sanchez

Secretario: Sr. Dr. Arupato Diaz Marquies

PEDRO RUIZ SALA

Madrid, 1996

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Dpto. de NUTRICION Y BROMATOLOGIA II

**APLICACION DEL DIOXIDO DE CARBONO  
SUPERCritico AL PROCESADO DE  
ALIMENTOS: NATA, SUBPRODUCTOS DEL  
REFINADO DE ACEITES VEGETALES Y ZUMO  
DE NARANJA**

PEDRO RUIZ SALA

Madrid, 1996

**GUILLERMO SANTA-MARÍA BLANCO, Dr. EN CIENCIAS QUÍMICAS,  
INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL INSTITUTO DE FERMENTACIONES  
INDUSTRIALES DEL C.S.I.C.**

CERTIFICA: Que el presente trabajo titulado “Aplicación el dióxido de carbono supercrítico al procesado de alimentos: nata, subproductos del refinado de aceites vegetales y zumo de naranja”, y que constituye la memoria que presenta D. Pedro Ruiz Sala para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Tecnologías Sectoriales bajo mi dirección.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Madrid a diecisiete de octubre de mil novecientos noventa y seis.



Guillermo Santa-María Blanco

*Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Fermentaciones Industriales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección del Dr. Guillermo Santa-María Blanco, Investigador Científico del CSIC, a quien agradezco su esfuerzo y espíritu crítico en la realización de esta Tesis.*

*También me gustaría expresar mi agradecimiento:*

*A la Dra. María Teresa Orzáez Villanueva, del Departamento de Nutrición y Bromatología II de la Facultad de Farmacia, por haber aceptado ser ponente de esta Tesis.*

*A la Dra. Carmen Polo Sánchez, Directora del Instituto de Fermentaciones Industriales, donde se ha realizado el presente trabajo experimental, por las facilidades con que he contado para el mismo.*

*Al Ministerio de Educación y Ciencia, por la concesión de una beca de Formación del Personal Investigador, lo que posibilitó llevar a cabo esta Tesis Doctoral.*

*Al Dr. Agustín Olano Villén, Profesor de Investigación del CSIC, por su asesoramiento en todo momento.*

*A las doctoras Isabel Martínez Castro, M<sup>a</sup> Carmen Gómez-Cordovés de la Vega y M<sup>a</sup> Luisa Jimeno Herranz por su asesoramiento durante algunas fases de este trabajo.*

*Al Dr. Murat Balaban por aceptarme durante mi estancia en la Universidad de Florida. A Canan, también a Diego, Pedro, Mercedes, Bridget y todas las personas que hicieron tan agradable el tiempo pasado en Gainesville.*

*A Julián Pastor, por haber sido tanta su imprescindible ayuda. A Maribel Jiménez, por su ayuda desinteresada y por haberme presentado a sus padres.*

*A mis compañeros Mayte, Mar, M<sup>a</sup> Carmen, Nieves, Elena, Toñi, Marta, Pepa, María, Ninfa, Daniel, Loli, Amado y a todos los demás del Instituto de Fermentaciones Industriales que me han dejado con un imborrable buen recuerdo.*

*Muy especialmente a Conchi y a Cristina, que siempre y en todo momento han estado y estarán conmigo. A Ricardo, Raquel, Jon, Juani, Susana, David, Lourdes, Esther y a todas las personas que me han hecho pasar buenos momentos durante estos cuatro años. A María y a Federico, por ser tan encantadores y por esas tardes inolvidables de los sábados frente al piano. A Carlos, estupendo compañero durante la interminable PSS. A Jacinto, que está conmigo en este último año de mi Tesis. A mis familiares de Madrid, por su apoyo, sobre todo en mis comienzos. A mi familia, que me ha visto tan poco estos años.*



# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

Nomenclatura de los ácidos grasos

Otros términos

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS..... 1

1.1. FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	2
1.1.1. Definición de fluido supercrítico .....	2
1.1.2. Propiedades de los fluidos supercríticos .....	4
1.1.3. Principios de la extracción supercrítica .....	7
1.2. APLICACIÓN A LOS ALIMENTOS DEL DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO.....	13
1.2.1. Aplicación de la extracción con dióxido de carbono supercrítico .....	13
1.2.1.1. Grasas vegetales y animales.....	14
1.2.1.2. Procesado de cítricos .....	16
1.2.2. Aplicación de la extracción a nivel industrial .....	17
1.2.2.1. Descafeinización del café .....	17
1.2.2.2. Extracción del lúpulo.....	18
1.2.2.3. Extracción de especias.....	18
1.2.3. Aplicaciones no convencionales del dióxido de carbono supercrítico al procesado de cítricos .....	19
1.2.4. Otras aplicaciones del dióxido de carbono supercrítico .....	20
OBJETIVOS.....	21

<b>PLAN DE TRABAJO.....</b>	<b>22</b>
-----------------------------	-----------

<b>CAPÍTULO 2. APLICACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO A LA MODIFICACIÓN DE GRASA LÁCTEA EN NATA.....</b>	<b>23</b>
---	-----------

<b>2.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>24</b>
-------------------------------	-----------

2.1.1. Lípidos.....	24
---------------------	----

2.1.1.1. Ácidos grasos .....	24
------------------------------	----

2.1.1.1.1. Ácidos grasos saturados .....	25
--	----

2.1.1.1.2. Ácidos grasos monoinsaturados.....	25
---	----

2.1.1.1.3. Ácidos grasos poliinsaturados .....	26
--	----

2.1.1.1.4. Ácidos grasos ramificados.....	26
---	----

2.1.1.1.5. Ácidos grasos con otros grupos funcionales .....	27
---	----

2.1.1.2. Lípidos simples.....	27
-------------------------------	----

2.1.1.2.1. Triglicéridos y compuestos relacionados .....	27
--	----

2.1.1.2.2. Ésteres de esteroides .....	28
--	----

2.1.1.2.3. Otros lípidos simples.....	29
---------------------------------------	----

2.1.1.3. Lípidos complejos.....	29
---------------------------------	----

2.1.1.3.1. Glicerofosfolípidos.....	29
-------------------------------------	----

2.1.1.3.2. Gliceroglicolípidos.....	30
-------------------------------------	----

2.1.1.3.3. Esfingolípidos .....	31
---------------------------------	----

2.1.1.4. Composición de la fracción insaponificable.....	32
--	----

2.1.1.4.1. Monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos.....	33
---	----

2.1.1.4.2. Triterpenos.....	33
-----------------------------	----

2.1.1.4.3. Carotenoides .....	34
-------------------------------	----

2.1.1.4.4. Esteroides .....	34
-----------------------------	----

2.1.2. Composición de la leche .....	35
--------------------------------------	----

2.1.2.1. Composición de la grasa láctea.....	36
--	----

2.1.3. Composición de las leches de vaca, oveja y cabra .....	41
---	----

2.1.4. La grasa láctea y los trastornos cardiovasculares .....	43
2.1.4.1. Valor nutritivo de la leche .....	43
2.1.4.2. La grasa láctea y los trastornos cardiovasculares.....	44
2.1.5. Las posibilidades del uso de la grasa láctea modificada.....	46
2.1.5.1. Adición de otras grasas .....	47
2.1.5.2. Fraccionamiento .....	48
2.1.5.3. Hidrogenación .....	49
2.1.5.4. Interesterificación .....	49
2.1.5.5. Biomodificación .....	49
2.1.5.6. Aplicación de la grasa láctea modificada .....	50
2.1.6. Tecnologías para la obtención de productos bajos en colesterol .....	51
2.1.6.1. Métodos microbiológicos.....	51
2.1.6.2. Adsorción .....	51
2.1.6.3. Manipulación de la alimentación animal.....	52
2.1.7. Análisis de los ácidos grasos de los alimentos por cromatografía de gases	52
2.1.7.1. Preparación de la muestra .....	53
2.1.7.2. Sistema cromatográfico.....	55
2.1.8. Análisis de los triglicéridos por cromatografía líquida de alta eficacia.....	57
2.1.8.1. Sistema cromatográfico.....	59
2.1.8.2. Análisis cuali-cuantitativo.....	59
2.1.9. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ de alta resolución en lípidos .....	62
2.1.9.1. Estudio de la grasa láctea.....	63
2.1.9.2. Estudio de aceites vegetales.....	65
2.1.9.3. Estudio de aceites de pescado .....	66

## **ESTIMACIÓN DE LA COMPOSICIÓN EN TRIGLICÉRIDOS DE LA GRASA LÁCTEA ..... 67**

<b>2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
2.2.1. Preparación de la muestra .....	67
2.2.2. Análisis de los triglicéridos de grasa láctea por cromatografía líquida de alta eficacia.....	68
2.2.3. Recogida de fracciones .....	69
2.2.4. Análisis de los ácidos grasos de triglicéridos de fracciones de HPLC por cromatografía de gases .....	69
2.2.4.1. Preparación de la muestra .....	69
2.2.4.2. Sistema cromatográfico.....	70
2.2.4.3. Análisis cualitativo .....	71
2.2.4.4. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) .....	72
2.2.4.5. Análisis cuantitativo .....	73
2.2.5. Desarrollo de modelos matemáticos .....	74
2.2.6. Estimación de la composición en triglicéridos de la grasa láctea de leche de oveja .....	78
2.2.7. Comparación de la composición en triglicéridos de la grasa de leche de oveja, cabra y vaca .....	79
<b>2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>80</b>
2.3.1. Análisis de los ácidos grasos de triglicéridos de fracciones de HPLC por cromatografía de gases .....	80
2.3.1.1. Análisis cualitativo .....	80
2.3.1.2. Análisis por GC/MS .....	80
2.3.1.3. Análisis cuantitativo .....	86
2.3.2. Análisis cualitativo de los triglicéridos de la grasa de leche de oveja.....	87
2.3.2.1. Aplicación de los modelos matemáticos.....	87

2.3.2.2. Estimación de la composición en triglicéridos de grasa láctea ovina .....	97
2.3.3. Comparación de la composición en triglicéridos de la grasa de leche de oveja, cabra y vaca .....	116

## **APLICACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO A LA MODIFICACIÓN DE GRASA LÁCTEA EN NATA ..... 122**

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	122
2.4.1. Preparación de la muestra .....	122
2.4.2. Descripción del equipo de extracción .....	122
2.4.3. Optimización del flujo de CO <sub>2</sub> supercrítico .....	124
2.4.4. Optimización del volumen de CO <sub>2</sub> supercrítico .....	125
2.4.5. Determinación de la grasa de la nata .....	125
2.4.6. Medida de la humedad de la nata .....	125
2.4.7. Análisis de colesterol por cromatografía líquida de alta eficacia.....	126
2.4.7.1. Obtención de la fracción insaponificable de la nata .....	126
2.4.7.2. Análisis de colesterol por HPLC.....	127
2.4.8. Análisis de triglicéridos por cromatografía líquida de alta eficacia .....	127
2.4.9. Efecto de la presión y la temperatura en la extracción de grasa de nata sin y con adición de bolas de vidrio .....	127
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	128
2.5.1. Optimización del flujo de CO <sub>2</sub> supercrítico .....	128
2.5.2. Optimización del volumen de CO <sub>2</sub> supercrítico .....	130
2.5.3. Efecto en la extracción de grasa .....	130
2.5.4. Efecto sobre la humedad de la nata .....	135
2.5.5. Efecto sobre la extracción de colesterol.....	137
2.5.6. Efecto sobre la extracción de triglicéridos.....	142
2.5.7. Selectividad del CO <sub>2</sub> supercrítico en la extracción de colesterol.....	147

ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE $^{13}\text{C}$ -RMN .....	149
---	-----

2.6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	149
--------------------------------	-----

2.6.1. Preparación de la muestra y extracción de la grasa de la nata .....	149
--	-----

2.6.2. Análisis de los extractos mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ .....	149
---	-----

2.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	150
-----------------------------------	-----

2.7.1. Análisis de los extractos mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ .....	150
---	-----

CAPÍTULO 3. APLICACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO A LA MODIFICACIÓN DEL DESTILADO DE LA DESODORIZACIÓN DE ACEITES VEGETALES .....	163
---	-----

3.1. INTRODUCCIÓN.....	164
------------------------	-----

3.1.1. Los aceites vegetales .....	164
------------------------------------	-----

3.1.2. El aceite de oliva.....	164
--------------------------------	-----

3.1.3. Aceites de semillas oleaginosas.....	165
---	-----

3.1.4. Desodorización del aceite de oliva .....	166
---	-----

ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DEL DESTILADO DE LA DESODORIZACIÓN DE ACEITES VEGETALES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA.....	168
--	-----

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	168
--------------------------------	-----

3.2.1. Preparación de la muestra .....	168
--	-----

3.2.2. Descripción del equipo.....	169
------------------------------------	-----

3.2.3. Análisis cualitativo.....	170
----------------------------------	-----

3.2.3.1. Elección de la columna.....	170
3.2.3.2. Elección de la fase móvil .....	171
3.2.3.3. Elección del gradiente.....	171
3.2.3.4. Elección de la temperatura de la columna .....	172
3.2.3.5. Análisis estadístico .....	172
3.2.4. Análisis cuantitativo.....	173
3.2.4.1. Estudio del detector. Análisis estadístico .....	173
3.2.4.2. Linealidad de la respuesta.....	177
3.2.4.3. Cálculo del factor de respuesta .....	177
3.2.4.4. Precisión del método .....	178
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	178
3.3.1. Análisis cualitativo.....	178
3.3.1.1. Análisis estadístico en la elección de la columna y la fase móvil .....	178
3.3.1.2. Elección del gradiente.....	192
3.3.1.3. Elección de la temperatura de la columna .....	199
3.3.2. Análisis cuantitativo.....	199
3.3.2.1. Análisis estadístico en el estudio de la respuesta del detector...	199
3.3.2.2. Linealidad de la respuesta.....	205
3.3.2.3. Factor de respuesta .....	212
3.3.2.4. Precisión del método .....	212
ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE <sup>13</sup> C-RMN .....	214
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	214
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	216

**APLICACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO AL  
DESTILADO DE LA DESODORIZACIÓN DE ACEITES VEGETALES..... 225**

3.6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	225
3.6.1. Descripción del equipo extractor.....	225
3.6.2. Optimización en la preparación de la muestra .....	225
3.6.3. Efecto de la presión y la temperatura en la extracción del destilado de la desodorización de aceites vegetales .....	227
3.6.4. Modificación del equipo de extracción.....	228
3.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	229
3.7.1. Optimización en la preparación de la muestra .....	229
3.7.2. Modificación del equipo extractor.....	229
3.7.3. Efecto de la presión y la temperatura en la extracción de los compuestos de la fracción insaponificable del destilado de la desodorización de aceites vegetales.....	237

**CAPÍTULO 4. APLICACIÓN DEL DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO A  
LA INACTIVACIÓN DE PECTINESTERASA EN ZUMO DE NARANJA ..... 247**

4.1. INTRODUCCIÓN. LOS CÍTRICOS .....	248
4.1.1. Composición de los cítricos .....	248
4.1.2. Sustancias pécticas.....	251
4.1.2.1. Estructura y composición.....	252
4.1.2.2. Ocurrencia y propiedades .....	253
4.1.3. Enzimas pécticos.....	255
4.1.4. Pectinesterasas en cítricos .....	257
4.1.4.1. Isoenzimas.....	258
4.1.4.2. Estabilidad de los isoenzimas .....	259
4.1.4.3. Estabilidad de la turbidez y actividad pectinesterásica .....	260



4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	260
4.2.1. Preparación de la muestra .....	260
4.2.2. Efecto sobre el zumo de naranja del tratamiento con dióxido de carbono en condiciones supercríticas.....	261
4.2.3. Determinación de la actividad pectinesterásica.....	263
4.2.4. Medida de la turbidez.....	263
4.2.5. Medida del color .....	264
4.2.6. Efecto del almacenamiento sobre la turbidez y el color .....	266
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	266
4.3.1. Efecto del tratamiento con dióxido de carbono supercrítico sobre la inactivación de la pectinesterasa de zumo de naranja.....	266
4.3.2. Efecto del tratamiento con dióxido de carbono supercrítico sobre la modificación de la turbidez del zumo de naranja .....	268
4.3.3. Efecto del tratamiento con dióxido de carbono supercrítico sobre la modificación del color del zumo de naranja.....	270
4.3.4. Modificación de la turbidez y el color del zumo de naranja durante el almacenamiento.....	278
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>281</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>283</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>300</b>

## ABREVIATURAS

### NOMENCLATURA DE LOS ÁCIDOS GRASOS

*ai* = anteiso

*ai*Ma = anteiso-margárico      *ai*-17:0

*ai*Pd = anteiso-pentadecanoico      *ai*-15:0

*br* = ramificado

Bu = Butírico      4:0

Ca = Cáprico      10:0

Cl = Caprílico      8:0

Co = Caproico      6:0

*i* = iso

*i*Ma = iso-margárico      *i*-17:0

L = Linoleico      9*c*,12*c*-18:2

La = Láurico      12:0

Ln = Linolénico      9*c*,12*c*,15*c*-18:3

M = Mirístico      14:0

Ma = Margárico      17:0

Mi = Miristoleico      9*c*-14:1

O = Oleico      9*c*-18:1

P = Palmítico      16:0

Pa = Palmitoleico      9*c*-16:1

Pd = Pentadecanoico      15:0

S = Esteárico      18:0

V = *trans*-vaccénico      11*t*-18:1

## OTROS TÉRMINOS

**$^{13}\text{C}$ -RMN** = Resonancia magnética nuclear del  $^{13}\text{C}$

**DDG** = Destilado de la desodorización de aceite de girasol

**DDO** = Destilado de la desodorización de aceite de oliva

**FAME** = Éster metílico de los ácidos grasos

**FC** = Fuerzas de cizallamiento

**GC** = Cromatografía de gases

**HPLC** = Cromatografía líquida de alta eficacia

**MUFA** = Ácido graso monoinsaturado

**MS** = Espectrometría de masas

**NC** = Número de carbonos

**ND** = Número de dobles enlaces

**NEC** = Número equivalente de carbonos

**NP** = Número de partición

**PUFA** = Ácidos grasos poliinsaturado

**SC** = Tratamiento con  $\text{CO}_2$  supercrítico

**TCN** = Número teórico de carbonos

**TG** = Triglicérido

**TIC** = Corriente total de iones

**UFA** = Ácidos graso insaturado

*Capítulo 1.*

*Introducción.*

*Extracción con fluidos supercríticos*

## 1.1- FLUIDOS SUPERCRTICOS

### 1.1.1- Definición de fluido supercrítico

Se puede definir fluido supercrítico como aquel que está sometido a condiciones de presión y temperatura por encima del punto crítico, siendo éste el punto designado por una temperatura crítica ( $T_c$ ) y una presión crítica ( $P_c$ ), por encima del cual no puede haber una liquefacción al elevar la presión o vaporización al aumentar la temperatura. La figura 1.1.1 representa un diagrama de fases donde se destaca la existencia de la región supercrítica sobre el punto crítico.

El punto crítico es característico de cada sustancia. La tabla 1.1.1 recoge la temperatura y presión críticas de varios de los solventes más utilizados. La densidad en el punto crítico se denomina densidad crítica ( $\rho_c$ ).

Tabla 1.1.1. Condiciones críticas de varios solventes

Compuesto	CClF <sub>3</sub>	CO <sub>2</sub>	SF <sub>6</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>	H <sub>2</sub> O
$T_c$ (°C)	28,8	31,1	45,5	196	347,2
$P_c$ (MPa)	21,48	7,20	3,80	3,29	21,48
$\rho_c$ (g/mL)	0,58	0,47	-	0,23	0,32

Las propiedades de los fluidos supercríticos son expresadas frecuentemente en términos reducidos más que en absolutos. Un valor reducido se define como el cociente entre el valor absoluto considerado y el valor correspondiente al punto crítico. Por tanto, si la presión y temperatura reducidas ( $P_r$  y  $T_r$ ) son superiores a la unidad, la sustancia en cuestión se haya sometida a condiciones supercríticas.

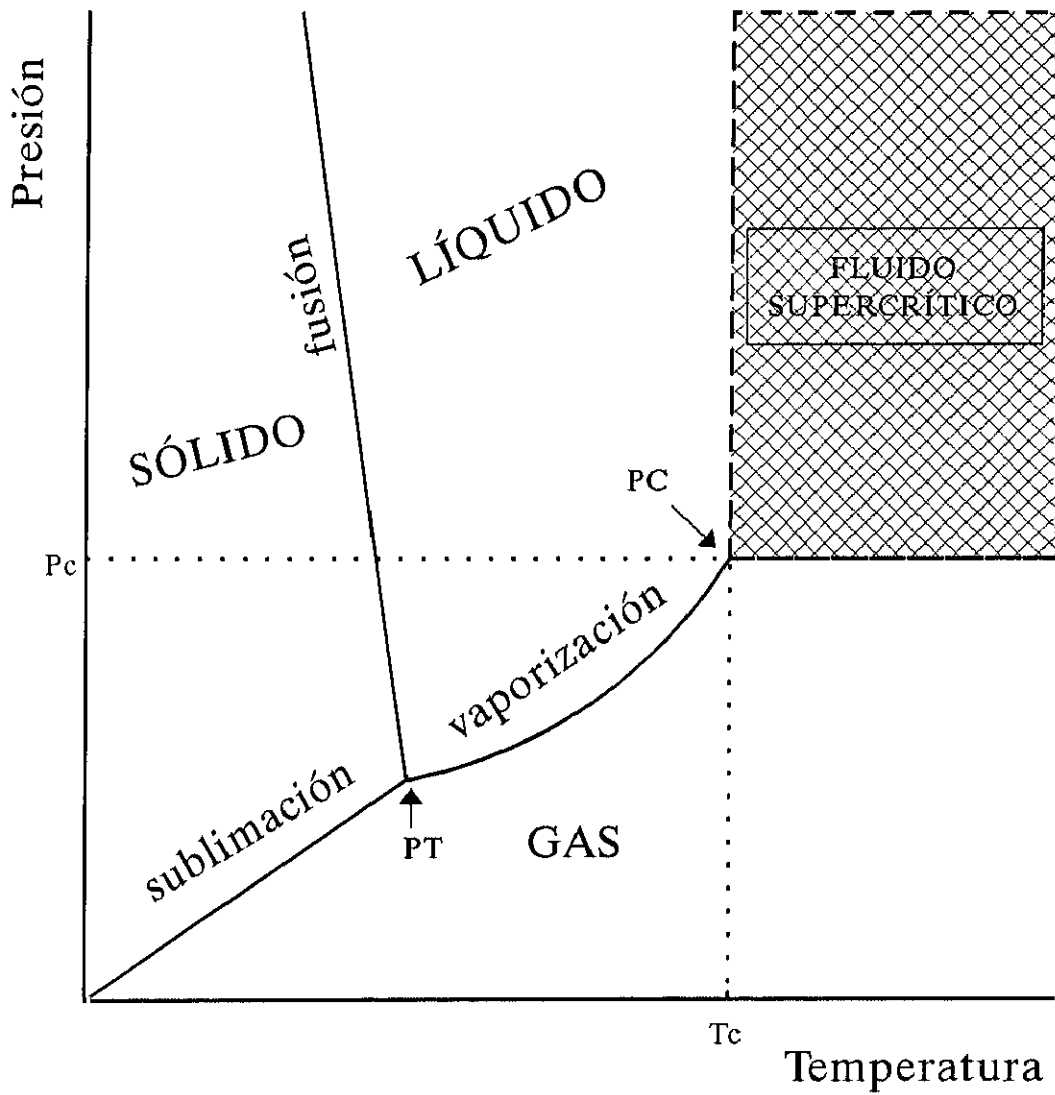


Figura 1.1.1. Diagrama de fases sólido-líquido-gas-fluido supercrítico. PT = punto triple, PC = punto crítico,  $P_c$  = presión crítica,  $T_c$  = temperatura crítica.

### 1.1.2- Propiedades de los fluidos supercríticos

La figura 1.1.2a resume las propiedades básicas y de mayor utilidad de los fluidos supercríticos. Los fluidos supercríticos poseen unas propiedades físico-químicas intermedias entre las de los líquidos y los gases (tabla 1.1.2).

**Tabla 1.1.2.** Propiedades físico-químicas de los gases y los líquidos en comparación con las del dióxido de carbono supercrítico.

		Densidad (g/mL)	Viscosidad (g/cm·s)	Coefficiente de Difusión (cm <sup>2</sup> /s)
<b>Gases</b>		(0,1-2) 10 <sup>-3</sup>	(1-3) 10 <sup>-4</sup>	0,1-0,4
<b>CO<sub>2</sub> supercrítico</b>	T <sub>c</sub> , P <sub>c</sub>	0,47	3 × 10 <sup>-4</sup>	7 × 10 <sup>-4</sup>
	T <sub>c</sub> , 6P <sub>c</sub>	1,0	1 × 10 <sup>-3</sup>	2 × 10 <sup>-4</sup>
<b>Líquidos</b>		0,6-1,6	(0,2-3) 10 <sup>-2</sup>	(0,2-2) 10 <sup>-5</sup>

La densidad del fluido supercrítico es de 100 a 1000 veces mayor que la de un gas, y comparable a la de un líquido. En consecuencia, las interacciones moleculares pueden ser fuertes permitiendo acortar las distancias intermoleculares (Knowles y col., 1988). Como resultado, las propiedades de solvatación son similares a las de los líquidos, pero con viscosidades significativamente más bajas y coeficientes de difusión más altos.

Al ser de 10 a 100 veces más bajos los valores de viscosidad y de 10 a 100 veces más altos los coeficientes de difusión respecto a los de los líquidos hacen que la transferencia de masa de solutos en extracciones con fluidos supercríticos sea significativamente más alta que la de extracciones con líquidos (Schneider, 1978).

Hay que resaltar que la variación de la densidad no es lineal respecto a la variación de temperaturas y presiones sobre el punto crítico. La figura 1.1.2b describe un diagrama de fases con las variables reducidas. En puntos cercanos al crítico pequeñas variaciones de la

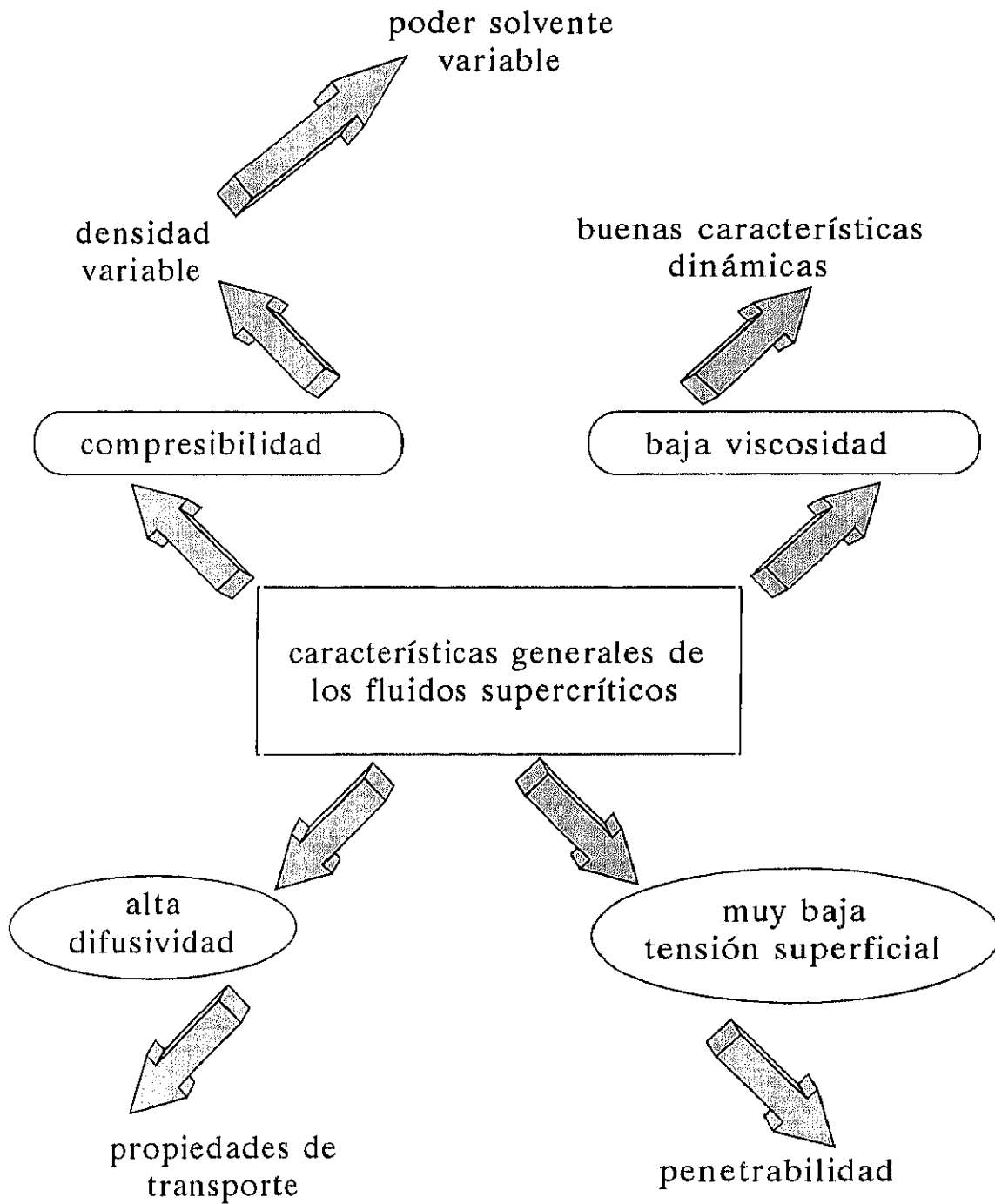
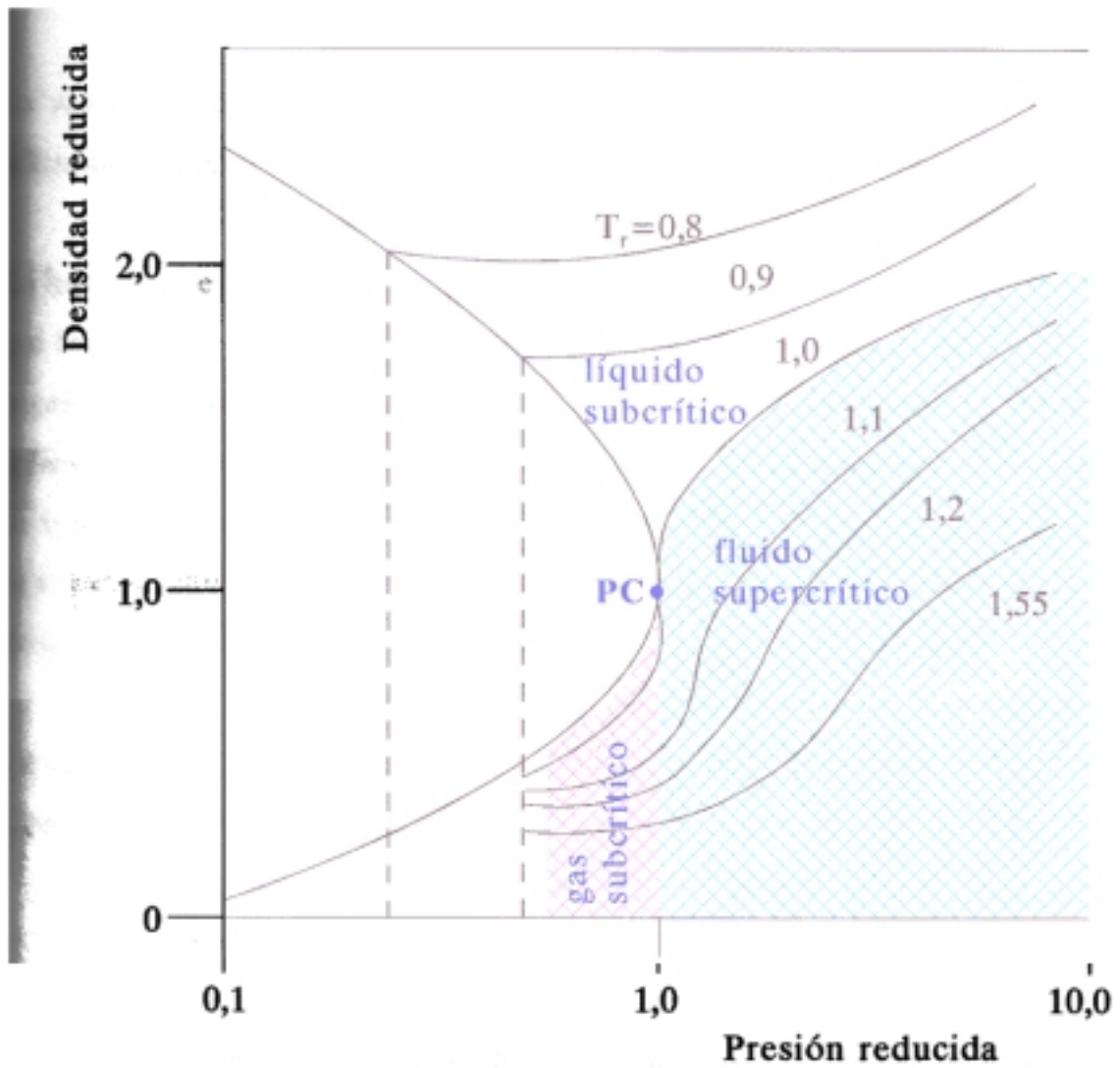


Figura 1.1.2a. Características principales de los fluidos supercríticos.





**Figura 1.1.2b. Representación bidimensional de presión y densidad reducidas con isotermas de temperatura reducida.**

presión a temperatura constante proporcionan grandes variaciones de la densidad. A presiones distantes de la crítica el aumento de la densidad no es tan acusado.

### *1.1.3- Principios de la extracción supercrítica*

La extracción con fluidos supercríticos es una técnica que estudia las propiedades solvatantes de un fluido por encima de su punto crítico.

La habilidad de un fluido supercrítico para la solubilización de sólidos fue ya señalada por Hannay y Hogarth en 1879 al solubilizar sales metálicas en etanol en condiciones supercríticas. Sin embargo, hasta los años cincuenta no aparecen estudios sobre aplicaciones industriales, concretamente para eliminar las fracciones ligeras del residuo de la destilación del crudo. A partir de los 70, La aplicación de los fluidos supercríticos a la industria agroalimentaria es uno de los más importantes centros de atención por parte de las investigaciones.

En comparación con otros tipos de extracción, las principales ventajas de la que utiliza fluidos supercríticos son:

1. menores tiempos de extracción,
2. uso, generalmente, de un fluido no tóxico, no inflamable o no corrosivo.
3. extracción a temperaturas sin afectación de compuestos termolábiles,
4. fácil separación de los solutos del fluido supercrítico. Esto no es posible en las extracciones convencionales en muchos casos, lo que crea contaminaciones indeseables del producto,

5. alta pureza del solvente,
6. posibilidad de realizar fraccionamientos,
7. posibilidad de seleccionar el tipo de extracción eligiendo la polaridad del fluido, su densidad y la utilización o no de modificadores,
8. bajo coste del solvente.

Las ventajas de la extracción con fluidos supercríticos provienen de las propiedades antes comentadas y de la compresibilidad. Según McHugh y Krukonis (1986) los grandes cambios de densidad del fluido y, en consecuencia, el poder de solvatación, pueden ser realizados mediante pequeños cambios en la presión a temperatura constante al haber una gran compresibilidad si se trabaja a temperaturas próximas a la crítica.

Al depender la fuerza solvatante de un fluido supercrítico de su densidad, la posibilidad de solvatación de un fluido supercrítico hacia una sustancia en particular puede ser modificada fácilmente cambiando la presión de extracción y, en menor medida, la temperatura. Esto hace que la extracción con fluidos supercríticos sea selectiva.

Además, con la propiedad de que la transferencia de masa está mejorada, el uso de la extracción con fluidos supercríticos proporciona tiempos de extracción más breves y una eficiencia de extracción mejorada por una mejor penetración en la matriz (Wright y col., 1987).

Schneider (1978) descubrió que el poder solvente de un fluido supercrítico no podía ser explicado exclusivamente desde el aumento de densidad. El poder solvente de estos fluidos depende de dos efectos:

- efecto de estado, que depende el estado físico del fluido supercrítico y su principal variable es la densidad,
- efecto químico, que define la interrelación entre el fluido supercrítico y el soluto. Es diferente para cada soluto y depende de su polaridad, propiedades ácido-básicas y de la formación de puentes de hidrógeno.

En general, un incremento de la presión a temperatura constante produce un incremento en la solubilidad del compuesto pero disminuye la selectividad (Zadow, 1988). El efecto de la temperatura sobre la solubilidad es más complejo, ya que ésta puede aumentar, disminuir o permanecer invariable con el aumento de temperatura a presión constante. Este comportamiento viene dado por un factor predominante, que puede ser la presión de vapor del soluto o la densidad del solvente. A bajas presiones, la solubilidad disminuye levemente con el aumento de temperatura; a altas presiones, aumenta marcadamente. El primer efecto se debe a la disminución de la densidad, el segundo se debe a que hay un importante aumento de la presión de vapor del soluto frente a la pequeña variación de la densidad del solvente en esta zona de altas presiones. Con una densidad determinada, la solubilidad aumenta con la temperatura (Luque de Castro y col., 1994).

La estructura química del soluto también es un factor a tener en cuenta a la hora de mejorar su selectividad. De modo esquemático se pueden citar los siguientes grupos funcionales de los solutos y su efecto beneficioso o adverso sobre su solubilidad en CO<sub>2</sub> supercrítico:

*aumentan la solubilidad:*

- insaturaciones,
- ramificaciones,
- esterificaciones,
- eterificaciones,

*disminuyen la solubilidad:*

- el aumento del peso molecular,
- aromaticidad,
- hidroxilos,
- carboxilos,
- halógenos,
- aminas,
- nitroderivados.

Se puede concluir que la elección de un fluido supercrítico depende de:

- a.- la polaridad del soluto,
- b.- poder solvente y selectividad requeridos,
- c.- estabilidad térmica del compuesto a extraer a la temperatura de operación,
- d.- limitaciones instrumentales, que se asocian a la presión crítica de algunos fluidos,
- e.- toxicidad del fluido supercrítico.

Normalmente, el fluido supercrítico es utilizado a una temperatura poco mayor a su temperatura crítica y a una presión significativamente mayor a su presión crítica (Brignole y col., 1987).

Se ha estudiado una gran variedad de fluidos supercríticos para la extracción que cubre un amplio rango de temperatura y presión críticas, pesos moleculares y polaridad (Hoyer,

1985). El dióxido de carbono es el más usado por tener una presión crítica moderada (7,2 MPa) y baja temperatura crítica (31 °C), siendo de elección para la extracción de compuestos termolábiles. Sin embargo, el CO<sub>2</sub> también tiene sus limitaciones, sobre todo para la extracción de compuestos polares. La tabla 1.1.3 lista una serie de fluidos supercríticos usuales con sus ventajas e inconvenientes. El agua no es usada por las dificultades técnicas que supone trabajar a presiones por encima de su punto crítico.

Actualmente, un tema de gran interés es la correlación y predicción de equilibrios de fases a alta presión. Ya se han descrito un gran número de diagramas de fases para mezclas binarias (fluido supercrítico y compuesto sólido o líquido) (Schneider, 1978), aunque la predicción de los equilibrios no está todavía satisfactoriamente resuelta. Y, por supuesto, mucho más complejos son aquellos sistemas para mezclas ternarias. Aunque de la misma forma que para los equilibrios líquido-líquido y líquido-sólido, para los sistemas ternarios o más complejos se comprueba que los fluidos supercríticos son disolventes específicos que permiten realizar una extracción selectiva o un fraccionamiento.

Sin embargo, en 1982, Chrastil desarrolló una ecuación para predecir, en un sistema binario, la solubilidad de un compuesto en un fluido supercrítico. Esta correlación empírica es a la vez de simple, relativamente fiable. Chrastil comparó, asimismo, los datos con los obtenidos experimentalmente en su laboratorio y con datos de la bibliografía en una amplia variedad de compuestos y en un gran rango de presiones y temperaturas, resultando haber acuerdo entre los resultados. La ecuación es la que se expone a continuación:

$$C = \rho^k e^{(a/T+b)} \quad (1.1)$$

donde  $C$  = concentración de un soluto en el fluido supercrítico (g/L),

$\rho$  = densidad del fluido (g/L),

$k$  = constante,

Tabla 1.1.3. Ventajas y desventajas de los fluidos supercríticos más comúnmente utilizados.

Propiedades	Inorgánicos				Orgánicos		
	CO <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	N <sub>2</sub> O	CFCs	HC	Alcoholes
Toxicidad	V	D	V		V	V	D
Inflamabilidad	V	D	V		V	D	D
Coste	V	D	V		V	V	D
Reactividad	V	D	D	D	V	V	D
Facilidad de alcanzar condiciones supercríticas	V	D	D	V	V	V	D
Agresividad medioambiental	V		V		D		
Gas en condiciones ambientales	V		D	V	V	V	D
Compatibilidad con detectores	V					D	
Polaridad	D	V		V	V	D	V

<sup>a</sup> En la práctica no se usa como fluido supercrítico.

CFCs = clorofluorocarbonos; HC = hidrocarburos.

V = ventaja; D = desventaja.

$a = \Delta H/R$ , siendo  $\Delta H$  el calor de reacción total y  $R$  la constante de los gases,

$b = \ln(M_a + kM_b) + q - k \ln(M_b)$ , siendo  $M_a$  y  $M_b$  los pesos moleculares del soluto y del gas y  $q$  otra constante.

Otros autores han utilizado la ecuación de estado de Peng-Robinson para predecir equilibrios de fases de sistemas binarios con resultados satisfactorios (Sigmund y Trebble, 1992).

## 1.2- APLICACIÓN A LOS ALIMENTOS DEL DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

### 1.2.1- Aplicación de la extracción con $CO_2$ supercrítico

A continuación se detallan los procedimientos de extracción supercrítica aplicada en el campo de los alimentos. Algunos investigadores realizan experiencias utilizando patrones de compuestos o mezclas de éstos, sin embargo, Nilsson y Hudson (1993) resaltan que los datos obtenidos de esta manera poseen un bajo valor predictivo para un posterior estudio con mezclas complejas, siendo entonces muy necesario realizar las experiencias con muestras reales desde un principio.

#### *Extracción completa*

Requiere condiciones de presión y temperatura máximas. La temperatura máxima de operación generalmente dependerá de las propiedades fisicoquímicas del sustrato a extraer, mientras la presión máxima de operación vendrá limitada por el diseño del equipo extractor.



### *Fraccionamiento*

Se lleva a cabo mediante una serie de pasos bajo diferentes condiciones de presión y temperatura.

### *Desodorización*

Las condiciones para la desodorización son menos fuertes que las utilizadas para la extracción completa o el fraccionamiento ya que el objetivo es la extracción de aquellos compuestos más solubles.

Muchos ejemplos de este tipo de aplicación están incrementándose en el campo de los productos naturales, especialmente en el de la industria alimentaria. Aquí, el CO<sub>2</sub> tiene más ventajas sobre otros solventes gaseosos o líquidos por las causas citadas anteriormente.

El CO<sub>2</sub> supercrítico es preferible al líquido ya que las sustancias a ser extraídas son mucho más solubles, la relación de extracción sería de 2,5 veces más alta dada la mayor difusividad en las condiciones supercríticas, y hay un mayor rango de posibles temperaturas para operar.

#### 1.2.1.1- Grasas vegetales y animales

El área más investigada a nivel de planta piloto y escala semipreparativa es la extracción de aceites de origen vegetal (Hubert y Vitzthum, 1978; Stahl y col., 1980; Bulley y col., 1984; Christianson y col., 1984; List y col., 1984; Taniguchi y col., 1985; Dakovic y col., 1989; Polak y col., 1989).

Friedrich y List (1982) y Zhao y col. (1987) pusieron de manifiesto que el aceite obtenido con CO<sub>2</sub> supercrítico a partir de la soja y del salvado de arroz tenía una serie de ventajas en relación al obtenido con un solvente orgánico como el hexano. Así, observaron que el

contenido en hierro y fósforo era más bajo, fundamentalmente debido a la baja solubilidad de los fosfolípidos en el CO<sub>2</sub> supercrítico frente a los triglicéridos. Por otra parte, el aceite era menos coloreado, lo que conlleva la no necesidad de refinamiento. Esto también era debido a la baja solubilidad de los carotenos y otros pigmentos. Otros estudios se encaminan a la purificación de lípidos polares, como el de Weidner y col. (1993), que consiguen optimizar las condiciones en un sistema continuo en contracorriente para el desengrasado de soja, de esta forma obtienen un extracto oleoso que no contiene lecitina, mientras que el residuo del aceite original está compuesto prácticamente por éste fosfolípido. Compuestos antioxidantes, como los tocoferoles también son objeto de estudio para la extracción con fluidos supercríticos (Lee y col., 1991, a partir de aceites de semillas) y pigmentos, como los carotenoides a partir de zanahorias (Barth y col., 1995; Vega y col., 1995). Estos últimos realizaron extracciones utilizando etanol como modificador para facilitar la extracción de los carotenos, partiendo de subproductos de industrias productoras de zumo de zanahoria.

En los últimos años, el desarrollo de nuevas tecnologías para intentar extraer el colesterol de la grasa se justifica dado el papel que éste desempeña en la aparición de trastornos cardiovasculares. Estos estudios se han realizado principalmente en huevo (Froning y col., 1990; Hung y Unger, 1995), estudiando también la afectación de las proteínas (Arntfield y col., 1992) y grasa láctea, pero también en otros alimentos, como en pollo (Froning y col., 1994). Otros estudios se han encaminado hacia la obtención de grasa modificada de origen lácteo o marino para conseguir extractos y fracciones de diferente composición y características físicas (Kaufmann y col., 1982; Shishikura y col., 1986; Yamaguchi y col., 1986; Hardardottir y Kinsella, 1988). Algunos de los trabajos estudian la obtención de grasa láctea modificada a partir de grasa anhidra realizando diferentes tipos de fraccionamiento, obteniendo resultados bastante similares, en los que las fracciones obtenidas a bajas densidades estaban enriquecidas en triglicéridos de cadena corta y, amenudo, media, mientras que las fracciones obtenidas a altas densidades eran ricas en triglicéridos de cadena larga por estar agotado el resto de triglicéridos en el residuo. La extracción de colesterol alcanza su máximo rendimiento en las primeras fracciones (Arul

y col., 1987 y 1988; Bradley, 1989; Kankare y col., 1989; Hammam y col., 1991; Chen y col., 1992a).

La obtención de extractos ricos en ácidos grasos poliinsaturados esenciales es otros de los objetivos de los investigadores. Muchos de los trabajos realizados en este campo estudian la extracción selectiva de ácidos docosahexanoico y eicosapentanoico a partir de aceites de pescado (Byeung, 1993; Jungro, 1993; Mishra y col., 1993; Temelli y col., 1995).

Otros nuevos estudios sobre la utilidad de la extracción con fluidos supercríticos se encamina hacia el aprovechamientos de subproductos que sean ricos en compuestos de interés, como lo es el escualeno en la industria de los cosméticos y los esteroides como metabolitos relacionados en la biosíntesis de hormonas esteroideas. Bondioli y col., 1992; 1993) estudiaron el destilado de la desodorización de aceite de oliva (subproducto con una fracción mayor de material insaponificable que el aceite virgen) como posible fuente de estos compuestos tras la realización de ensayos de extracción con dióxido de carbono supercrítico.

#### 1.2.1.2- Procesado de cítricos

##### *Eliminación de amargos*

Kimball (1987) utilizó el dióxido de carbono supercrítico para la extracción de triterpenos amargos, principalmente la limonina de zumo de naranja. Utilizó temperaturas de 30 a 60 °C y presiones de 21,4 a 42,8 MPa. Los resultados concluyeron que la temperatura no tenía un efecto significativo en la extracción de limonina, pero sí era efectivo el aumento de la presión. También se extraía limoneno en bajas cantidades, pero no había cambios de pH, ácido ascórbico, contenido en pulpa, aminoácidos y porcentaje de ácidos.

### *Extracción o concentración de aceites esenciales de cítricos*

Los aceites esenciales de cítricos son mezclas de mono y sesquiterpenos, compuestos oxigenados y un residuo no volátil (Temelli y col., 1988). Los aromas de limón fueron extraídos por Kalra y col. en 1987; utilizaron presiones entre 9,31 y 10,69 MPa y temperaturas de 50, 60 y 80 °C. Observaron que un aumento de temperatura hizo aumentar la extracción de limoneno y citral selectivamente según las condiciones, así, es posible extraer selectivamente los componentes del limón y fraccionar los extractos.

Temelli en 1987 observó que, en general, los compuestos terpénicos eran más solubles en dióxido de carbono que los compuestos oxigenados. Esta conclusión es razonable, ya que los terpenos son compuestos apolares, tienen bajo peso molecular y alta presión de vapor, siendo más solubles en dióxido de carbono supercrítico; por tanto, la mayor parte del extracto es limoneno. Las condiciones pueden ajustarse a 70 °C y 8,3 MPa para minimizar los compuestos del aroma perdidos por la extracción.

Favati y col. en 1988 extrajeron carotenos y luteína de concentrados de proteínas de hojas por CO<sub>2</sub> supercrítico. Se piensa que estos métodos se pueden usar para la extracción de carotenoides de subproductos de naranjas.

### *1.2.2- Aplicaciones de la extracción a nivel industrial*

#### 1.2.2.1- Descafeinización del café

Este proceso se está utilizando de forma comercial en Alemania desde 1978. El proceso, según Zosel (1978), consiste en una extracción a partir de café verde en remojo con CO<sub>2</sub> a 16-22 MPa y 90 °C que se recicla continuamente. En una torre de agua se produce la despresurización, donde se acumula la cafeína en una operación que dura 10 h. La cafeína se recupera por destilación. El contenido de cafeína de los granos desciende desde un 0,7-3% hasta un 0,02%. La cafeína se extrae selectivamente, no se extraen

sustancias que contribuyen al aroma del café. También se puede conseguir la recuperación del soluto por adsorción sobre carbón activo.

#### 1.2.2.2- Extracción del lúpulo

El lúpulo es el ingrediente responsable de las características aromáticas y el sabor amargo de la cerveza. Sus constituyentes principales son las humulonas y lupulonas. Ambos son ácidos grasos insaturados con alrededor de 25 átomos de carbono y grupos carbonilo e hidroxilo, se extraen bien con CO<sub>2</sub> supercrítico. Para la extracción las bolitas de lúpulo comercial no se someten a ningún tipo de preparación a parte de la pulverización. En 1983 se finalizó la construcción de una planta de extracción supercrítica con una capacidad de 5000 toneladas en Alemania.

#### 1.2.2.3- Extracción de especias

El uso de CO<sub>2</sub> supercrítico se prefiere al de diclorometano, usado tradicionalmente. Actualmente se llevan a cabo extracciones de pimienta negra, chillies y nuez moscada para conseguir extractos que posean el aroma y las características ardientes de las especias (Hubert y Vitzthum, 1978).

La piperina es el constituyente principal de la pimienta negra (98%) y responsable del ardor de ésta. Las extracciones de pimienta negra, seguidas de la transferencia de la fase supercrítica a una celda de separación en condiciones de presión y temperatura por debajo del punto crítico producían un extracto que contenía casi el 98% de la piperina.

### *1.2.3. Aplicaciones no convencionales del dióxido de carbono supercrítico al procesado de cítricos*

Una solución de dióxido de carbono en agua causa la reducción del pH, afectando los enzimas y microorganismos. Entre los enzimas investigados pueden nombrarse la  $\alpha$ -amilasa, glucosa oxidasa, lipasa, catalasa (Taniguchi y col., 1987), polifenoloxidasas y pectinesterasa (Zemel, 1989; Arreola, 1990). La turbidez es un importante atributo de calidad del zumo de naranja y otros cítricos y se estabiliza al protegerla de la acción de la pectinesterasa.

El tratamiento con dióxido de carbono supercrítico se basa en la hipótesis de que éste junto con el agua del zumo dan lugar a ácido carbónico, bajando el pH temporalmente e inactivando el enzima. Cuando la presión vuelve a ser la atmosférica, el dióxido de carbono se separa del zumo, restaurándose el pH original (Balabon y Arreola, 1991). De esta forma podrían evitarse temperaturas tan altas como en el tratamiento térmico convencional.

La calidad de un zumo también depende de los cambios de flavor causados por microorganismos que pueden desarrollarse a pH bajos (Mertens y Knorr, 1992). Sin embargo, al conseguir pH menores debido a la formación de ácido carbónico puede limitarse el desarrollo de estas bacterias y hongos, pudiendo ser beneficioso su uso. Kamihira y col. en 1987 encontraron un efecto esterilizante del dióxido de carbono supercrítico en *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger* a 20,3 MPa y 35 °C cuando el contenido de agua fue de 70 al 90%. Los microorganismos en seco no eran esterilizados cuando se trataban en las mismas condiciones. Molin (1983) estudió el efecto inhibitorio de CO<sub>2</sub> al 100% de varios microorganismos incluyendo el género *Lactobacillus* y encontró que se enlentecía la velocidad de crecimiento.

La calidad de un zumo también depende de otros atributos como el pH, estabilidad al almacenamiento, sólidos solubles totales (°Brix), acidez total, color, contenido de ácido ascórbico, flavor, aroma y apariencia. Estos atributos de calidad de un zumo pueden verse afectados por el tratamiento por dióxido de carbono supercrítico.

#### *1.2.4- Otras aplicaciones del dióxido de carbono supercrítico*

Por último, algunas aplicaciones van encaminadas a la inactivación de polifenoloxidasas en crustáceos (langosta y gamba) y patata, para evitar el cambio hacia colores desagradables durante la conservación (Chen y col., 1992b; 1993).

El desengrasado de alimentos para la obtención de derivados ricos en proteínas es otra de las aplicaciones de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. Maheshwari y col. (1995) estudiaron varios métodos para la eliminación de compuestos que provocan olores desagradables en concentrados de proteínas de soja, siendo el supercrítico el que proporciona mejores resultados, Wu y col. (1990, 1994) lo realizan en proteínas y fibra alimentaria de maíz, y Temelli y col. (1995) utilizan el dióxido de carbono supercrítico para desengrasar las proteínas de músculo de caballa. El desengrasado también se ha aplicado a alimentos transformados como patatas fritas, salchichas, manteca de cacahute, queso, galletas y hamburguesas (Sutter y col., 1994; Hopper y col., 1995; Webster, 1995).

## OBJETIVOS

En el área de la Tecnología de los Alimentos, las novedosas técnicas de extracción que se basan en el empleo de dióxido de carbono supercrítico poseen claras ventajas sobre aquellas consideradas como convencionales, tanto por su inocuidad debida a las propiedades del fluido como por las amplias posibilidades de realización de extracciones selectivas de unos compuestos respecto a otros en matrices complejas. Con el fin de contribuir al avance sobre la aplicación de esta técnica junto con el desarrollo de nuevos productos de mayor calidad y el aprovechamiento de subproductos, se plantearon los siguientes objetivos:

- disminución del contenido en colesterol de la grasa de la nata mediante la extracción con CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas,
- fraccionamiento de la grasa láctea de la nata, mediante la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, para la obtención de extractos lipídicos de diferente composición triglicéridica que pueden ser utilizados en la elaboración de distintos alimentos,
- aprovechamiento de los destilados de la desodorización de aceites de oliva y girasol, subproductos del refinado de éstos, para la obtención, de modo selectivo mediante la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, de escualeno, producto de gran uso a nivel industrial,
- mejora de la calidad de los zumos de naranja comerciales por inactivación de la pectinesterasa mediante el tratamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico.



## PLAN DE TRABAJO

El desarrollo del trabajo ha incluido las siguientes etapas:

- estimación de la composición en triglicéridos de la grasa de leche de oveja, cabra y vaca mediante cromatografía líquida de alta eficacia en combinación con la aplicación de modelos matemáticos y cromatografía de gases,
- aplicación de la extracción con CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas a la extracción de colesterol y modificación de la grasa presente en la nata,
- estimación de las distintas familias de compuestos lipídicos por espectroscopía de resonancia magnética nuclear del <sup>13</sup>C.
- desarrollo y optimización de métodos analíticos, cromatografía líquida de alta eficacia, para la determinación de los esteroides y escualeno, y su aplicación al análisis de los destilados de la desodorización de aceites de oliva y girasol,
- aplicación de la extracción con CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas a la extracción de escualeno de los destilados de la desodorización de aceites de oliva y girasol,
- tratamiento con CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas del zumo de naranja para la inactivación de la pectinesterasa y estudio de la modificación de la turbidez y el color.

## ***Capítulo 2.***

### ***Aplicación de la extracción con dióxido de carbono supercrítico a la modificación de grasa láctea en nata***

## 2.1- INTRODUCCIÓN

### 2.1.1- Lípidos

No existe una definición satisfactoria universalmente aceptada sobre la palabra "lípido". En general se describen los lípidos como aquellos compuestos que son solubles en disolventes orgánicos como cloroformo, éteres y alcoholes, lo que incluye a los esteroides, carotenoides, terpenos y ácidos biliares junto a los ácidos grasos y los acilglicerol. Últimamente se considera que este criterio de clasificación es bastante vago y sirve mejor para distinguir entre típicos lípidos y los típicos glúcidos y proteínas, dejando bastantes casos de clasificación dudosa.

Hay autores que definen los lípidos como los ácidos grasos y sus derivados o sustancias relacionadas biosintética o funcionalmente (Christie, 1989, Gunstone y Herslöf, 1992). Esta definición incluye la mayoría de los compuestos conocidos tradicionalmente como lípidos, se incluyen los ésteres de esteroides, pero no los esteroides libres. Si tenemos en cuenta esta segunda definición podemos dividir los lípidos en dos grupos:

*lípidos simples* aquellos que tras la saponificación dan como productos dos compuestos por mol como mucho (ácidos grasos, glicerol, etc), como son los triglicéridos o los ésteres de colesterol,

*lípidos complejos* si producen tres o más compuestos por mol inicial tras la saponificación, como los fosfolípidos y glicolípidos. Fosfolípidos y glicolípidos pueden dividirse también en glicero- y esfingolípidos.

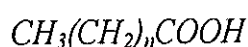
#### 2.1.1.1- Ácidos grasos

Los ácidos grasos son lípidos presentes en plantas, animales y microorganismos que contienen cadenas de átomos de carbono unidas a un grupo carboxílico en un extremo.

Pueden contener dobles enlaces (*cis* o *trans*), ramificaciones, otros grupos funcionales y generalmente son de cadena par. Según el número de insaturaciones se clasifican en saturados, mono y poliinsaturados.

#### 2.1.1.1.1- Ácidos grasos saturados

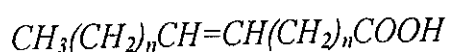
Existen en la naturaleza ácidos grasos saturados de 2 a 36 átomos de carbono, siendo los más abundantes los de 14, 16 y 18 carbonos. Los ácidos de cadena lineal siguen la fórmula:



Los ácidos grasos saturados de 12 o más átomos de carbono son sólidos a temperatura ambiente, con menos átomos se presentan en estado líquido.

#### 2.1.1.1.2- Ácidos grasos monoinsaturados

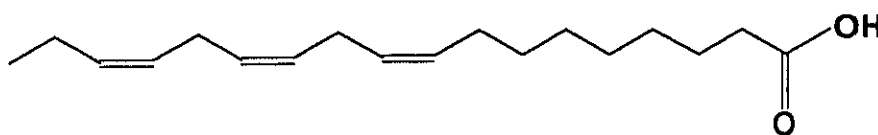
Estos ácidos grasos contienen un único doble enlace en su estructura. Este doble enlace puede estar en diferentes posiciones en la cadena carbonada y presentar las configuraciones *cis* o *trans*. La fórmula general se corresponde con la siguiente:



Los ácidos *cis*-monoenoicos con 18 carbonos o menos tienen puntos de fusión por debajo de la temperatura ambiente, los isómeros *trans* poseen puntos de fusión algo superiores. La presencia de insaturaciones provoca una mayor susceptibilidad a la oxidación que los ácidos saturados.

#### 2.1.1.1.3- Ácidos grasos poliinsaturados

Estos ácidos grasos poseen más de un doble enlace en la cadena carbonada. Pueden subdividirse en varias familias de acuerdo a su procedencia desde un precursor específico de su biosíntesis. Cada una de estas familias contiene desde 2 hasta un máximo de 6 dobles enlaces separados por grupos metilénicos y una misma estructura terminal. Estas familias son principalmente las de los ácidos (n-9), (n-6) y (n-3), según la posición de la última insaturación respecto al final de la cadena. De especial importancia son los ácidos de la familia (n-3), como el ácido  $\alpha$ -linolénico, por ser esenciales en la dieta animal y humana. Por otra parte, se ha comprobado que los ácidos de la familia (n-3) reducen el desarrollo de tumoraciones como el cáncer de mama (Coll Hellín, 1988).



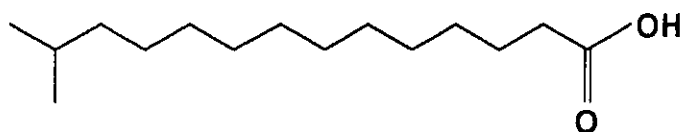
ácido  $\alpha$ -linolénico

En general, los ácidos grasos poliinsaturados son de bajo punto de fusión y son de más fácil deterioro por oxidación o autooxidación.

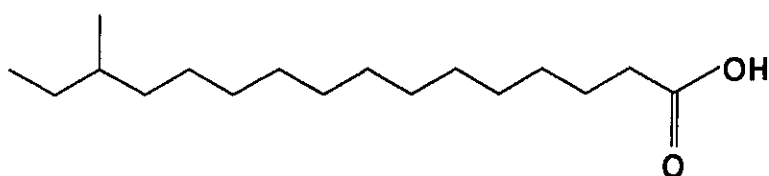
#### 2.1.1.1.4- Ácidos grasos ramificados

Los ácidos grasos ramificados se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, pero como componentes minoritarios excepto en bacterias. Generalmente la ramificación

consiste en un solo grupo metilo en el penúltimo (*iso*) o antepenúltimo (*anteiso*) átomo de carbono.



ácido *iso*-pentadecanoico



ácido *anteiso*-margárico

#### 2.1.1.1.5- Ácidos grasos con otros grupos funcionales

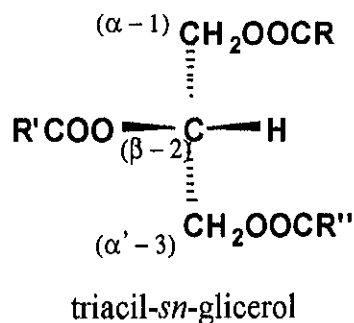
De entre los hidroxiácidos es particularmente importante el ácido araquidónico y el grupo de los eicosanoides por ser intermedios en la síntesis de prostanoïdes. También existen ácidos grasos con grupos furanoides, ciclopropanos, ciclopentanos y ciclohexanos.

### 2.1.1.2-Lípidos simples

#### 2.1.1.2.1- Triglicéridos y compuestos relacionados

Los triglicéridos (o triacilgliceróles) son compuestos formados a partir de una molécula de glicerol en la que cada grupo hidroxilo está esterificado por un ácido graso. En la

naturaleza son biosintetizados por sistemas enzimáticos, lo que determina que esté presente uno de los isómeros.



La mayoría de grasas y aceites de animales y plantas consisten casi exclusivamente en triglicéridos. En aceites vegetales suele haber triglicéridos compuestos por ácidos grasos insaturados, en grasas animales como el tejido adiposo predominan ácidos de cadena larga (16 y 18 carbonos) y en la grasa láctea ácidos de cadena corta. Las grasas de pescado y de mamíferos marinos contienen en su fracción triglicéridica altas proporciones de ácidos grasos poliinsaturados de 20 y 22 átomos de carbono.

Los mono y diglicéridos contienen uno y dos moles de ácidos grasos por mol de glicerol respectivamente, y frente a los triglicéridos son minoritarios en la naturaleza. Aparecen como intermedios en la biosíntesis de triglicéridos y otros lípidos, y también en la hidrólisis de éstos.

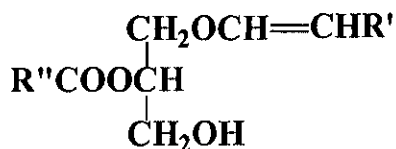
#### 2.1.1.2.2- Ésteres de esteroides

Los esteroides pueden esterificarse con los ácidos grasos dando lugar a los ésteres de esteroides. En las plantas se encuentran ésteres de  $\beta$ -sitosterol, ergosterol, estigmasterol, etc., y en animales predominan los ésteres de colesterol.

### 2.1.1.2.3- Otros lípidos simples

Entre otros lípidos simples de menos interés en nuestro estudio podemos citar los alquildiacilgliceroles y plasmalógenos neutros, y los ésteres de ceras.

Los alquildiacilgliceroles están formados por sustitución de un ácido graso de un triglicérido por una cadena alquílica mediante un enlace éter, Los plasmalógenos neutros contienen un enlace viniléter con la configuración *cis* y se han detectado en algunos tejidos de origen animal en bajas cantidades.



plasmalógeno neutro

Entre los ésteres de ceras más comunes se encuentran aquellos formados por la esterificación de un ácido graso con alcoholes grasos de longitudes similares. Se encuentran tanto en vegetales como en animales y microorganismos, y con diferentes funciones.

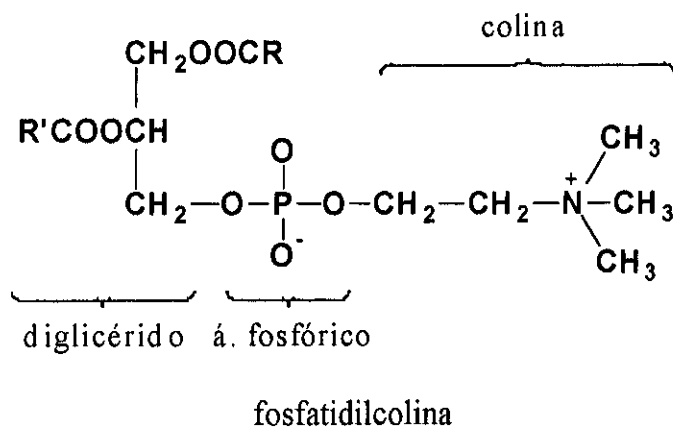
### 2.1.1.3- Lípidos complejos

#### 2.1.1.3.1- Glicerofosfolípidos

Son compuestos con la estructura de 1,2-diacil-*sn*-glicerol-3-fosfato o ácido fosfatídico, en los que al grupo fosfato se une un grupo polar. Se agrupan en familias dependiendo de la base a la que está unido el resto de ácido fosfórico. La fosfatidilcolina, comunmente



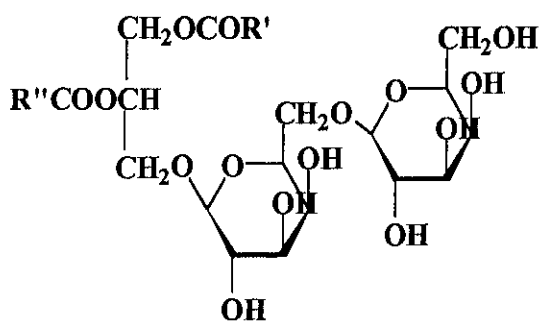
llamada lecitina, es el lípido más abundante en las membranas de tejidos animales, también aparece en membranas de vegetales y, en algunos casos, de microorganismos.



Entre otros glicerofosfolípidos pueden citarse el fosfatidilglicerol, encontrado en cloroplastos, difosfatidilglicerol (o cardiolipina), en las mitocondrias del tejido muscular, fosfatidiletanolamina (o cefalina), fosfatidilserina y fosfatidilinositol. Cada clase de las nombradas anteriormente tiene una composición distintiva en ácidos grasos según el tejido al que pertenezcan, aunque generalmente los ácidos saturados se encuentran en posición *sn*-1 y los insaturados en *sn*-2.

#### 2.1.1.3.2- Gliceroglicolípidos

Los tejidos vegetales son especialmente ricos en lípidos en los que los 1,2-diacil-*sn*-gliceroles están unidos a un glúcido en la posición *sn*-3 mediante enlace glicosídico. Los principales son el mono y digalactosildiacilglicerol, el primero de ellos también se encuentra en pequeñas cantidades en el tejido nervioso de algunas especies animales y ambos son importantes en la composición de los cloroplastos.

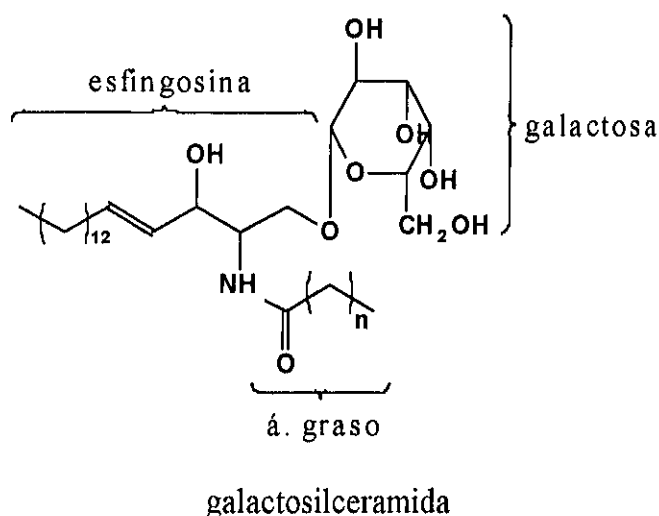


digalactosildiacylglicerol

#### 2.1.1.3.3- Esfingolípidos

La característica fundamental de estos lípidos es que están formados por una base de cadena larga (12 a 22 carbonos) hidroxilada, con un doble enlace *trans* en la posición 4 y unida a un ácido graso, siendo la esfingosina la base más abundante. Se encuentran en animales, plantas y microorganismos.

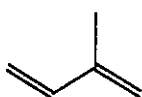
Las ceramidas contienen un ácido graso unido al grupo amino de la base mediante un enlace amida y se encuentran en los tejidos como intermedios en la síntesis de esfingolípidos complejos o de su degradación. La esfingomielina es una ceramida que incorpora fosforilcolina en su molécula y es uno de los lípidos más importantes del tejido nervioso de los animales. Los cerebrósidos son glicosfingolípidos ya que incorporan a la estructura de la ceramida glucosa o galactosa y se encuentran principalmente entre los lípidos del cerebro. Los gangliósidos son oligoglicosilceramidas muy complejas, conteniendo ácido siálico, glucosa, galactosa y galactosamina y aparecen principalmente en células ganglionares del sistema nervioso central.



#### 2.1.1.4- Composición de la fracción insaponificable

En este grupo se incluye una serie de compuestos que no se consideran lípidos, pero que se caracterizan por ser hidrocarburos o derivados oxigenados de éstos, son liposolubles y presentan afinidades marcadas con los lípidos.

De una parte, aparecen hidrocarburos saturados acíclicos en pequeña proporción en la fracción insaponificable; sin embargo, la mayor parte de los compuestos pertenecen, por su forma de originarse, a una serie de productos naturales que alcanza una extraordinaria diversificación estructural y en la cual se encuentran representantes de destacada significación biológica. Es el grupo de los isoprenoides o poliprenos, que se pueden considerar resultantes de la polimerización de un hidrocarburo básico de 5 átomos de carbono, el isopreno.

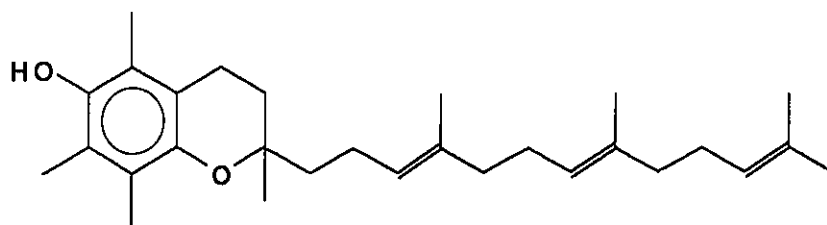


Isopreno

La agregación de grupos isoprénicos origina sustancias que reciben nombres relacionados con la denominación terpenos.

#### 2.1.1.4.1- Monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos

Son sustancias que abundan especialmente en vegetales, sobre todo en esencias, ya que suelen ser de elevada volatilidad, y en resinas y bálsamos. El fitol es un diterpeno que forma parte de la estructura de la clorofila, es constituyente de las vitaminas liposolubles E (tocoferoles) y K, y está muy relacionado en su estructura con la de la vitamina A.

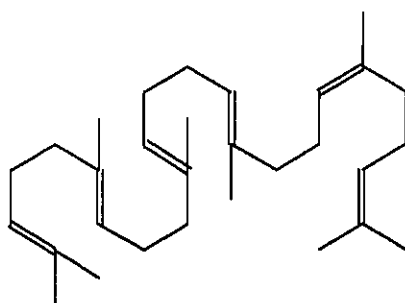


$\alpha$ -tocoferol

#### 2.1.1.4.2- Triterpenos

Están constituidos por 6 unidades isoprenoides y se encuentran en aceites de pescado y vegetales, resinas y saponinas.

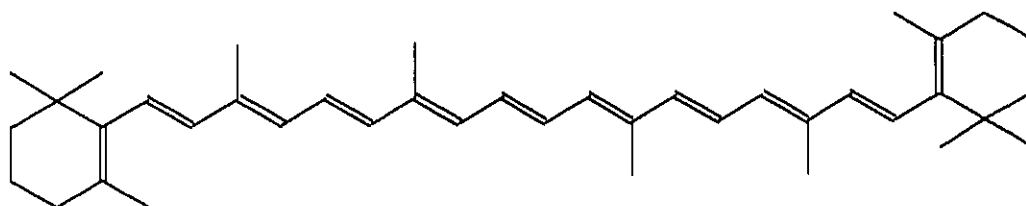
Un triterpeno no cíclico muy importante es el escualeno, que se aísla fundamentalmente del insaponificable de aceites de hígado de peces óseos o cartilagosos. Su importancia reside en su papel de producto intermedio en la síntesis de los restantes triterpenos cíclicos y de los esteroides.



escualeno

#### 2.1.1.4.3- Carotenoides

Los carotenoides son compuestos profusamente repartidos entre los vegetales, también se encuentran en animales y microorganismos. Los carotenos ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) poseen uno o dos ciclos en los extremos de la molécula y su escisión por el doble enlace central da lugar a la formación de vitamina A.



$\beta$ -caroteno

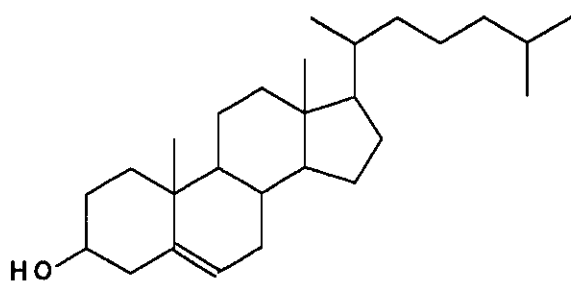
Existen muchos derivados oxigenados de los carotenoides, como la xantofila y el licoxanteno, también se han descrito derivados cetónicos, ácidos, aldehídos y epóxidos.

#### 2.1.1.4.4- Esteroides

El grupo de los esteroides comprende las sustancias naturales derivadas estructuralmente del ciclopentanoperhidrofenantreno. Estas sustancias engloban a compuestos como los

esteroles, ácidos biliares, estrógenos, andrógenos, gestágenos, corticoides, vitaminas del grupo D, etc.

Los esteroides poseen una cadena lateral en el carbono 17 y un hidroxilo en 3, y muy frecuentemente se encuentran esterificados con ácidos grasos. Son compuestos minoritarios pero se encuentran en casi todos los organismos. El colesterol se encuentra en casi todas las grasas de origen animal.



colesterol

Los esteroides presentes en organismos vegetales reciben el nombre genérico de fitosteroides, como lo son el estigmasterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol, etc.

### 2.1.2- Composición de la leche

La leche es un sistema coloidal constituido por una solución acuosa de lactosa, sales y otros muchos elementos en estado de disolución, en donde se encuentran las proteínas en estado de suspensión y la materia grasa en estado de emulsión. En la tabla siguiente se muestran los valores aproximados en que se encuentran los componentes de la leche de vaca (Riel, 1991); la composición exacta de una muestra de leche varía en función de múltiples factores y únicamente se puede conocer mediante su análisis.

Componentes

mayoritarios:

Agua	86,9%
Materias grasas	3,9%
Proteínas y sustancias nitrogenadas no proteicas	3,2%
Glúcidos	5,1%
Sales	0,9%

Componentes

minoritarios:

Enzimas  
Vitaminas  
Pigmentos (carotenos, xantofilas, riboflavina)  
Células diversas (células epiteliales, leucocitos, bacterias, levaduras, mohos)  
Otros elementos (dióxido de carbono, oxígeno, nitrógeno y otros gases)  
Sustancias extrañas

### 2.1.2.1- Composición de la grasa láctea

La composición de la grasa láctea es muy compleja y muy variable. Las variaciones en su composición se deben fundamentalmente a la especie de animal que se trate, raza, individuo, alimentación, estación del año, edad y período de lactación.

La materia grasa se encuentra en la leche formando glóbulos esféricos suspendidos en la fase acuosa del suero. El diámetro de éstos varía entre 2 y 10  $\mu\text{m}$ . Un glóbulo graso es una masa de triglicéridos envuelta en una membrana lipoproteica, membrana que posee

un espesor de cerca de  $0,005\ \mu\text{m}$  en el caso de un glóbulo graso de  $5\ \mu\text{m}$  (Veisseyre, 1980). Según Veisseyre (1980) y Riel (1991) los triglicéridos más insaturados y los que tienen un peso molecular más bajo, están situados en el centro del glóbulo, probablemente porque son líquidos y así quedan retenidos por los glicéridos sólidos que se localizan en la periferia. Los fosfolípidos, al ser anfífilos, estabilizan los glóbulos y están en cantidad suficiente como para formar una capa mono-molecular en la superficie de todos los glóbulos grasos. La parte polar se orienta hacia la fase acuosa y el segmento apolar hacia la fase lipídica. Las globulinas que también existen en las membranas y la carga total del glóbulo graso, que es negativa, contribuyen a mantener la estabilidad del glóbulo en emulsión. Además, la membrana contiene pequeñas cantidades de mono y diglicéridos, carotenoides, colesterol, metales (hierro, cobre, magnesio y zinc), agua ligada y enzimas (fosfatasa alcalina y xantino oxidasa) La figura 2.1.2.1 representa, de forma esquemática, la composición del glóbulo graso.



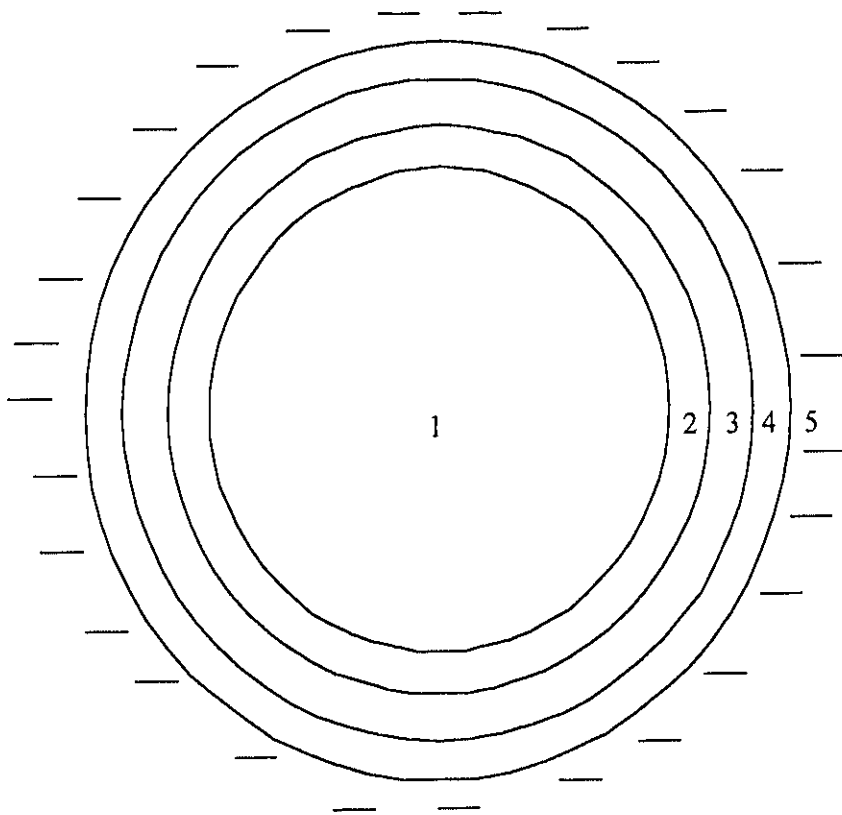


Figura 2.1.2.1. Estructura de un glóbulo graso

1: triglicéridos insaturados y de bajo peso molecular; 2: triglicéridos sólidos; 3: fosfolípidos; 4: lipoproteínas, enzimas, aglutininas; 5: cargas eléctricas.

Según Gunstone y col. (1986), la composición del glóbulo graso de la leche de vaca es la siguiente:

Componente Lipídico	Lípidos de Membrana (%)	Total en el Glóbulo Graso (%)
Carotenoides	0,45	tr
Escualeno	0,61	tr
Ésteres de Colesterol	0,79	tr
Triglicéridos	53,4	97-98
Ácidos Grasos Libres	6,3	0,10-0,44
Colesterol	5,2	0,22-0,41
Diglicéridos	8,1	0,28-0,59
Monoglicéridos	4,7	0,016-0,038
Fosfolípidos	20,4	0,2-1,0

La composición en ácidos grasos de la grasa láctea (tanto los que constituyen los triglicéridos, que son la mayoría, como los que se encuentran libres) es más compleja que la de los aceites vegetales. Esta complejidad se debe a varios factores (Walstra y Jenness, 1984), que incluyen:

a) ácidos grasos procedentes de la grasa de la dieta y que llegan a la glándula mamaria a través de la sangre y la linfa. En su mayoría son de 16 o más átomos de carbono,

b) ácidos grasos sintetizados en la glándula mamaria. Son ácidos de cadena corta y media, mirístico y parte de palmítico. Además, las células mamarias de rumiantes poseen una alta actividad desaturasa que insatura los ácidos esteárico y palmítico.

c) microorganismos en el rumen, que hidrogenan total o parcialmente ácidos grasos de 18 carbonos de los alimentos consumidos, por lo que introducen isómeros posicionales y geométricos de ácidos grasos monoinsaturados y también ácidos grasos ramificados en el total de la composición de ácidos grasos.

Según Gunstone y col. (1986) la grasa láctea es la mezcla grasa de origen natural más compleja debido a su composición en ácidos grasos y, por tanto, en triglicéridos. Se han caracterizado alrededor de 500 ácidos grasos, siendo unos 15 mayoritarios y existen numerosos isómeros mono y poliinsaturados y ramificados.

Los estudios de Breckenbridge y col. (1969), Marai y col. (1969) y Parodi (1982), sobre la distribución posicional en los triglicéridos de los ácidos grasos mayoritarios indican que los ácidos butírico y caproico se encuentran siempre en la posición *sn*-3 del triglicérido. Los ácidos caprílico y cáprico y los insaturados de 18 átomos de carbono se unen preferentemente en la misma posición que los anteriores, pero no exclusivamente. Otros ácidos grasos también tienen posiciones preferentes para la esterificación, como los ácidos láurico y mirístico en la posición *sn*-2 y palmítico y esteárico en la posición *sn*-1. Coincidiendo con los datos aportados con Anifantakis (1986), este tipo de distribución es común a casi todas las leches de mamíferos, incluyendo las de oveja y cabra.

La grasa láctea también contiene lecitinas, cefalinas, esfingomielinas y trazas de cerebrósidos. El contenido total de estos compuestos en la leche es de alrededor de un 0,03%, es decir, aproximadamente un 1% de los lípidos totales en leche. La contribución de las lecitinas es del 60%, la de las cefalinas del 30% y la de las esfingomielinas del 10%. El contenido de la leche en cerebrósidos no supera el 0,002% (Riel, 1991).

Los componentes insaponificables suponen un 0,4% de la masa de materia grasa. Cuantitativamente, los esteroides son los compuestos más importantes, principalmente el colesterol y sus precursores, el ergosterol y el 7-dehidrocolesterol. La exposición de estos

últimos a los rayos ultravioleta los transforma en vitaminas del grupo D. También se encuentra en la leche lanosterol y escualeno.

Además del colesterol de la fracción lipídica, también hay colesterol en la fase acuosa de la leche en forma de proteíno-colesterol y formando complejos en la membrana de los glóbulos grasos. Tiene papel emulsionante y se le atribuyen propiedades antilipolíticas de la leche.

Los tocoferoles son sinónimos de vitamina E, siendo el mayoritario de la leche el  $\alpha$ -tocoferol. Desde el punto de vista tecnológico, son antioxidantes naturales especialmente útiles para prevenir la oxidación de los fosfolípidos.

### *2.1.3- Composición de las leches de vaca, oveja y cabra*

La producción de leche de oveja y cabra es de gran importancia en algunos países donde las condiciones climáticas no son favorables para el mantenimiento del ganado vacuno. La producción mundial de leche de estas especies se sitúa en tercer y cuarto lugar tras la leche de vaca y la de búfala. Sin embargo, en algunos países del área mediterránea la producción de leche de estas especies ha revalorizado su importancia económica como resultado de una mayor aceptación a nivel mundial de los productos derivados de éstas. Este creciente interés ha sido evidente si tenemos en cuenta que los estudios realizados sobre leche de oveja y cabra se han duplicado en la última década. Aún así, los datos disponibles sobre la composición de estas leches son pocos si los comparamos con los que se poseen de leche de vaca, de mayor interés comercial y considerando también la limitación geográfica de la producción de leche de oveja y cabra y su contexto tradicional al que se han asociado.

A pesar de la baja producción de leche de oveja y cabra a nivel mundial, son de gran importancia en las regiones del Mediterráneo (Le Jaouen y Toussaint, 1993), Oriente Próximo, India y Europa del Este. La producción de leche de estas especies está encaminada fundamentalmente a la elaboración de quesos, pero en algunos países se utiliza también para producir yogures, mantequilla y leche fermentada, y la leche de cabra también se consume directamente como tal. Otros productos que van adquiriendo cada vez más importancia son aquellos encaminados a sustituir la leche de vaca por leche de cabra en los casos de aparición de alergias a sus proteínas o de malnutrición (Desjeux, 1993; Hachelaf y col, 1993; Razafindrakoto y col, 1993).

Este aumento del estudio de la leche de oveja y cabra ha dado como fruto trabajos que reúnen los últimos datos aportados, como los de Ramos y Juárez (1981, 1982, 1986a y b, y 1993), Juárez y Ramos (1984, 1986), Anifantakis (1986), Boyazoglu (1989), Yener (1989) y Mann (1994). En ellos se compara la composición de la leche de estas especies con la de vaca y la aplicación para la obtención de productos derivados.

Tal como señala Haenlein (1995), la composición de la leche de oveja y cabra varía dentro de un rango muy amplio debido a las diferencias genéticas entre especies, entre razas de una misma especie e incluso entre individuos de una misma raza, además de otros factores ya citados anteriormente, como ocurre en el caso de la leche de vaca. Remeuf (1993) descubrió que variantes genéticas de cabra conducían también a diferente cantidad de grasa en la leche. Sin embargo, se coincide en indicar el mayor valor nutritivo de la leche de oveja por tener mayor cantidad de grasa, proteínas, minerales y sólidos totales que la leche de vaca y cabra, siendo el mismo el contenido de lactosa. La leche de cabra tiene, por lo general, una composición más semejante a la de vaca. Según la bibliografía consultada por Juárez y Ramos (1984), la composición de la leche de oveja y cabra es la siguiente:

	Oveja	Cabra
Sólidos totales	15,8-23,4	11,33-18,68
Lípidos	4,54-12,60	2,84-7,78
Proteínas	4,3-6,77	2,64-5,30
Lactosa	4,19-5,25	3,91-6,30
Cenizas	0,79-0,95	0,77-0,95

Según los estudios de Anifantakis (1986) y Ramos y Juárez (1993), al comparar las leches de vaca, oveja y cabra, se vio que destaca un mayor contenido de los ácidos caproico, caprílico, cáprico y láurico en las de cabra y oveja (20-25% frente a 10-12% de la leche de vaca) y de palmítico, esteárico y oleico en la de vaca.

#### *2.1.4. La grasa láctea y los trastornos cardiovasculares*

##### 2.1.4.1- Valor nutritivo de la leche

La leche es un alimento nutricionalmente muy completo, sobre todo en la edad de crecimiento, ya que aporta proteínas de alto valor biológico y calcio, y también es rico en vitaminas A y B. Se puede decir que es un alimento de muy alto valor nutricional y de un bajo coste económico (Juansolo, 1992).

Sin embargo, tras el estudio de Vázquez-Martínez (1992), respecto a la evolución del consumo de leche y derivados en España hay que decir que experimentó un espectacular aumento entre 1964 y 1980, descendiendo a partir de entonces. En 1987 el consumo de leche en España fue de 125,5 kg/año/persona y continuó descendiendo hasta 109,3 kg/año/persona en 1990. Una de las causas de este descenso en el consumo es que se considera que la leche entera y sus derivados son alimentos con alto contenido en grasas

saturadas y colesterol, tipo de grasas que se recomiendan limitar en su consumo por su relación con la aparición de trastornos cardiovasculares (Cos Blanco, 1992).

#### 2.1.4.2- La grasa láctea y los trastornos cardiovasculares

La leche de vaca es popularmente conocida como un alimento con una importante cantidad de colesterol, si bien, no se tiene en cuenta que normalmente la leche de mujer tiene una cantidad mayor (Paul y Southgate, 1978) y que esto último se puede relacionar con que el organismo del lactante pueda metabolizar el colesterol de modo más efectivo (Mott, 1986).

Además de lo dicho anteriormente acerca del colesterol, la grasa láctea se considera también una grasa saturada, lo que incurre en un uso abusivo de este término. El porcentaje en que se encuentran los ácidos grasos saturados en la grasa de vaca está alrededor de un 60% del total, lo que significa que más de un tercio de los ácidos grasos son insaturados. Se puede añadir que es muy importante conocer la diversidad de ácidos grasos saturados que presenta la grasa láctea, encontrándose longitudes de cadena desde 2 a 20 carbonos. Los ácidos grasos de cadena corta y media (2 a 12 átomos de carbono) se digieren más rápidamente que los de cadena larga y se absorben por un mecanismo diferente, pasando directamente a la sangre, evitándose el paso por el hígado y siendo además fuente de energía de éste (Sickinger, 1975). Por tanto, no contribuyen al aumento de la concentración de lípidos en la sangre.

Los efectos adversos de los ácidos grasos saturados se deben fundamentalmente a que favorecen la elevación de la concentración de colesterol en la sangre. En esta consideración también se suele descuidar el hecho de que solamente dos de estos ácidos grasos producen este efecto de forma significativa (mirístico y palmítico). Recientes estudios han demostrado que el ácido esteárico no produce estos efectos (Bonanome y

Grundy, 1988). En resumen se puede concluir que solamente el 34% de los ácidos grasos de la grasa láctea tienen actividad hipercolesterolemizante.

Los ácidos grasos monoinsaturados se encuentran aproximadamente en un 32% del total, siendo el ácido oleico el mayoritario. En un principio se pensó que estos ácidos no elevaban los niveles sanguíneos de colesterol, pero que tampoco contribuían a hacerlos disminuir. Recientes estudios han reevaluado el efecto sobre el colesterol en sangre de ellos (Mattson y Grundy, 1985; Grundy, 1986; Mensink y Katan, 1987; Baggio y col., 1988; Grundy y col., 1988). Estos estudios han podido concluir que las dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados inducen menores niveles plasmáticos de colesterol y LDL que dietas altamente saturadas, y no producen variaciones en la trigliceridemia y en los niveles de las HDL. En comparación con dietas pobres en grasas y ricas en glúcidos se observó que producían menores valores de colesterolemia y mayores de HDL. En conclusión, los beneficios que aportan dietas que contienen ácidos grasos monoinsaturados parecen ser: en primer lugar disminuyen los niveles plasmáticos de colesterol y LDL, incluso cuando la dieta es altamente energética. No disminuyen los niveles de HDL, lo que puede ser ventajoso, ni elevan los de triglicéridos totales, lo que sí ocurre con dietas ricas en glúcidos. Finalmente, se oxidan con más dificultad que los ácidos grasos poliinsaturados (Gurr, 1989).

En lo referido a los ácidos grasos poliinsaturados, hay que decir que la grasa láctea es algo pobre debido a la hidrogenación que sufren en el rumen por los microorganismos. No se puede decir que la leche sea una de las fuentes más importantes de ácidos grasos esenciales. Sin embargo, no se puede por ello negar que la leche en sí es uno de los alimentos más importantes de la dieta.

Se dice normalmente que la leche es un alimento con alta concentración de colesterol, aunque contribuye modestamente al colesterol total ingerido en la dieta (sólo 55 mg/día de un total de 500 a 1000 mg/día). Junto a esto hay que considerar que el colesterol ingerido con los alimentos es solamente uno de los factores que influyen en la



concentración de colesterol plasmático (Beynen y col., 1987). Sin embargo, esto está en entredicho y hay diversidad de opiniones sobre la incidencia del colesterol de la dieta sobre los niveles plasmáticos.

### *2.1.5- Las posibilidades del uso de la grasa láctea modificada*

Históricamente, la grasa láctea ha sido muy utilizada, ya como leche en sí, nata o mantequilla. Sin embargo, ha habido una gran disminución en su consumo, sobre todo en los países occidentales, y es por esto que se están tomando medidas para que los consumidores no rechacen los productos lácteos que contengan toda su grasa. Todos los productos de carácter graso que se ofrecen en el mercado están siendo menos consumidos y coincide, además, que la mantequilla es el más caro de ellos.

La causa fundamental por la que se rechaza la mantequilla y la grasa láctea en general es por el contenido en ácidos grasos saturados considerados hipercolesterolemiantes y también por su contenido en colesterol. Estos dos factores han hecho que este alimento sea también apartado de las dietas que aconsejan los médicos.

El flavor y la textura de la mantequilla son considerablemente mejores que los de otras grasas, como las margarinas, que se usan como sustitutos; pero sus propiedades físicas y reológicas, especialmente la poca capacidad para untarse a la temperatura del frigorífico, hacen, también, que la mantequilla sea poco atractiva para los consumidores.

Para aquellos que demandan productos de buena calidad, de origen natural y buen sabor, la mantequilla seguiría siendo esencial en la dieta, pero otras veces el consumidor se decanta por productos de mezcla de mantequilla con aceites vegetales parcialmente hidrogenados para procurar una mayor untabilidad. Sin embargo, estas mezclas, realizadas según la tecnología de las margarinas, presentan algunos problemas en el sentido tecnológico y también científico. Los productos bajos en grasa presentan más

problemas y se relacionan con la inestabilidad de la emulsión y el consiguiente favorecimiento del crecimiento de microorganismos.

Es muy difícil que un único mercado de grasa láctea pueda compensar el descenso del consumo de sus derivados. Al contrario, parece que la solución se encuentra en aumentar el espectro de productos, en la diversificación. Para que esto se pueda llevar a cabo es necesario conocer a fondo la estructura de la grasa láctea y establecer las propiedades de los componentes que la forman. Este proceso ha sido ya llevado con éxito en la fracción proteica de la leche y sería deseable que se consiguiesen los mismos resultados con la grasa láctea.

Unas de las propiedades más valoradas de la grasa láctea son sus características organolépticas, mucho más apreciadas que las de otras grasas y aceites comestibles para la elaboración de productos de confitería, bollería y para untar. Sin embargo, en contra de estas ventajas encontramos inconvenientes que hacen que se modifique esta grasa para su consumo y se estudien nuevos métodos de modificación. Entre los inconvenientes podemos citar los anteriormente dichos y el precio, que encarece aún más las formas procesadas de la grasa láctea.

La complejidad de la composición de la grasa láctea hace posible que pueda ser modificada y fraccionada para obtener nuevos derivados con características físicas y organolépticas diferentes y de gran interés. Los métodos de modificación son los citados a continuación.

#### 2.1.5.1- Adición de otras grasas

La mezcla de dos o más grasas está ampliamente difundida en la producción de margarinas y otras grasas comestibles. Esta práctica es barata y puede realizarse en las

industrias lácteas. El mayor inconveniente es la modificación de los caracteres organolépticos, que no son preferidos frente a los de la grasa láctea original.

#### 2.1.5.2- Fraccionamiento

El fraccionamiento por cristalización se usa ampliamente y puede separar la grasa láctea en fracciones más o menos sólidas (Deffense, 1993). Existen tres métodos que se utilizan a gran escala:

1. El fraccionamiento mediante disolventes consiste en la cristalización de la grasa a partir de disoluciones en disolventes como hexano o acetona. Se obtienen buenas separaciones, pero el proceso es costoso y sólo se ha demostrado rentable en el fraccionamiento de manteca de cacao. También tiene el inconveniente de la completa eliminación de los disolventes, con la consecuente pérdida de los aromas naturales.
2. El fraccionamiento mediante detergentes se realiza por cristalización de la grasa fundida al adicionar soluciones detergentes acuosas. Una centrifugación separa la fase acuosa junto con los cristales de la fase oleosa. El gran inconveniente de este método es la total eliminación de los residuos de detergente.
3. En el fraccionamiento en seco la grasa se cristaliza por enfriamiento progresivo y se separa por filtración a vacío a partir de la grasa fundida. Este método no emplea reactivos químicos, siendo uno de los más adecuados, aunque es poco selectivo. El método Tirtiaux es utilizado a escala industrial. Este método es muy utilizado y es capaz de producir desde 1 hasta 5 fracciones en la grasa láctea anhidra, pero su principal inconveniente es el tiempo de espera para que se complete la nucleación y crecimiento de los cristales, que está entre 8 y 12 h (Tirtiaux, 1976).

#### 2.1.5.3- Hidrogenación

La hidrogenación es particularmente útil para elaborar grasas semisólidas a partir de aceites vegetales. La hidrogenación se ha usado en la grasa láctea para mejorar el mantenimiento de su calidad, si bien, presenta el inconveniente de la formación de isómeros *trans*.

#### 2.1.5.4- Interesterificación

La interesterificación es el resultado de un reordenamiento al azar de los ácidos grasos de una grasa, produciéndose una nueva mezcla de triglicéridos, y variando sus propiedades físicas. Aplicada sobre la grasa láctea, la interesterificación proporciona una mayor dureza, punto de fusión y contenido en grasa sólida. Esta técnica posee poco interés porque se realiza al azar.

#### 2.1.5.5- Biomodificación

La adición de enzimas para la modificación de las grasas constituye un método de reciente uso. Normalmente se utilizan lipasas para la modificación de aceites vegetales, ya que los costes son altos para su aplicación a la grasa láctea. Kemppinen y Kalo (1993) utilizan lipasa de *Pseudomonas fluorescens* para la modificación de la grasa láctea y posteriormente realizan un fraccionamiento. La interesterificación enzimática tiene bajos rendimientos. Últimamente se estudia el empleo del dióxido de carbono supercrítico para la obtención de triglicéridos estructurados.

#### 2.1.5.6- Aplicación de la grasa láctea modificada

Conseguir mantequillas más fáciles de untar cuando se encuentran a la temperatura del frigorífico ha sido una de las primeras aplicaciones. Las mezclas con aceites vegetales han sido las soluciones más ampliamente utilizadas; si a esto añadimos que los aceites vegetales pueden someterse a diferentes grado de hidrogenación obtenemos una diversidad de productos según sus propiedades físicas. Para obtener productos enteramente de origen lácteo se opta por fraccionar la grasa en tres fracciones y utilizar las de mayor y menor punto de fusión. También se puede usar la mantequilla hidrogenada totalmente para mezclarla con aceite de girasol y así obtener un producto bastante consistente rico en ácidos grasos poliinsaturados.

Las fracciones de alto punto de fusión se suelen utilizar en productos de bollería, beneficiándose de la consistencia de esta grasa y de su aroma y sabor. Las fracciones líquidas a temperatura ambiente pueden utilizarse para dar consistencia más suave a la mantequilla y para mejorar la reconstitución de la leche en polvo.

Las fracciones provenientes de la grasa láctea pueden utilizarse también en confitería. Una aplicación importante es la sustitución por grasa láctea de la manteca de cacao (más cara) en la fabricación del chocolate. La grasa láctea hidrogenada o las fracciones sólidas pueden ser utilizadas para evitar que los chocolates con leche sufran una separación en dos fases por romperse la emulsión. Se ha observado que hasta un 25% de la grasa de algunos chocolates es de origen lácteo.

Sin embargo, el alto precio de la grasa láctea es un obstáculo para el uso de sus procesos de modificación. Este problema se podría superar si pueden obtenerse productos de mejor calidad.

## 2.1.6- Tecnologías para la obtención de productos bajos en colesterol

### 2.1.6.1- Métodos microbiológicos

Algunos microorganismos como los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Serratia* y *Streptomyces* pueden convertir el colesterol en productos inocuos como son el dióxido de carbono y el agua (Aihara y col., 1988). Estos métodos aún no están totalmente desarrollados para su uso. En las condiciones estudiadas, la oxidación del colesterol no es completa y se producen elevados contenidos de óxidos de colesterol, que se consideran más aterogénicos que el propio colesterol. Existen otros microorganismos, como *Eubacterium*, que reducen el colesterol a coprostanol, metabolito inocuo, pero la aplicación de éstos métodos a los alimentos no es satisfactoria (Beitz y col., 1990).

### 2.1.6.2- Adsorción

El colesterol puede ser adsorbido a partir de grasa láctea anhidra utilizando carbón activo, pudiéndose eliminar hasta un 95% del colesterol.

Otra técnica, propuesta también en 1989 (anónimo), consiste en la formación de complejos insolubles con saponinas.

La  $\beta$ -ciclodextrina es un oligosacárido cíclico de siete unidades de glucosa. Su afinidad por moléculas apolares o de polaridad media permite la formación de fuertes complejos de inclusión con el colesterol. Bayol y col. (1988), Cully y col. (1990) y Roderbourg y col. (1990) han conseguido extraer el colesterol de lípidos o aceites, nata y yema de huevo mediante  $\beta$ -ciclodextrinas con éxito. Oakenfull y Sidhu (1992) describen un método utilizado en Australia que discurre a bajas temperaturas, habiendo una mínima afectación de los compuestos y pérdida de compuestos volátiles. Cuando este proceso se

leva a cabo en huevos o productos lácteos (leche o nata) se llega a eliminar hasta un 80-100% del colesterol total.

#### 2.1.6.3- Manipulación de la alimentación animal

Ha habido intentos de alterar los niveles de colesterol en huevos y sangre de gallina por medio de la manipulación de la dieta o de aditivos de la alimentación animal. Esto incluye el aumento de las cantidades de proteína, adición de salvado de avena, pectinas, gomas, escleroglucanos, ácido nicotínico, grandes cantidades de vitaminas A, C, etc.. En la mayoría de los casos los resultados no han sido los esperados. Sim y Bragg (1977) observaron que la adición de fitosteroles en la dieta de las gallinas contribuía a rebajar el colesterol sanguíneo, pero elevaba el contenido en el huevo, debido a que su efecto anticolesterolemiante era causado por una inhibición de la absorción del colesterol de la dieta, pero no tenía efectos sobre el metabolismo del colesterol. El colesterol no puede reducirse en más de un 15% únicamente mediante la dieta, lo que hace necesario emplear otros métodos (Saijpaul y col., 1994).

#### *2.1.7- Análisis de los ácidos grasos de los alimentos por cromatografía de gases*

La cromatografía ofrece unas grandes posibilidades de separación y posterior identificación de los ácidos grasos; más concretamente, la cromatografía de gases ha sido la técnica cromatográfica que más ha avanzado en los últimos años en el análisis de los ácidos grasos.

El análisis de los ácidos grasos puede dividirse en dos pasos sucesivos, que son la preparación de la muestra y la posterior separación cromatográfica.

#### 2.1.7.1. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra está encaminada hacia la formación de derivados volátiles a la temperatura del método cromatográfico, puesto que la mayoría de los ácidos grasos no son volátiles, sería imposible llevar a cabo la separación. También, la muestra ha de ser preparada para conseguir la hidrólisis de los ácidos grasos de los compuestos a los que estén esterificados, principalmente el glicerol. Los derivados volátiles más comunmente utilizados son los ésteres metílicos, por su gran sencillez y rapidez de la preparación. Sin embargo, presentan inconvenientes para el análisis cuantitativo cuando los compuestos formados son extremadamente volátiles, tal es el caso de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de cadena corta como el butírico, caproico, caprílico, etc.. Otro inconveniente del uso de ésteres metílicos se refiere al análisis cuantitativo de los ácidos grasos insaturados (especialmente los poliinsaturados), ya que éstos se oxidan fácilmente en el manejo de la muestra y se destruyen en el inyector por la alta temperatura necesaria para una rápida volatilización (Shantha y Napolitano, 1992). Pese a todo lo antes mencionado, los ésteres metílicos de los ácidos grasos son los derivados más útiles y también más utilizados cuando los inconvenientes se superan (por ejemplo, con un patrón interno).

Existen otros métodos para la volatilización de los ácidos grasos que pueden proporcionar mejores resultados cuando éstos se requieren. Pueden citarse los ésteres de butilo para reducir la volatilidad de los ésteres de los ácidos grasos de cadena corta, que pueden mejorar los factores de respuesta en un valor de 0,3 (Iverson, 1986). Otros métodos se utilizan para el análisis de ácidos grasos libres y esterificados por separado (Martínez-Castro y col., 1986; de la Fuente y col., 1993).

El análisis cromatográfico en sí de los ésteres metílicos puede hacer variar los resultados de un análisis cuantitativo, que están en función de que la esterificación haya sido cuantitativa antes de inyectar la muestra en el cromatógrafo de gases. Los factores a tener en cuenta para una reacción cuantitativa son principalmente los reactivos utilizados y el



tiempo necesario que ha de transcurrir para la esterificación completa. A esto hay que añadir que el método utilizado puede hacer variar la composición de los ácidos originales durante la reacción, aparecer nuevos isómeros geométricos y posicionales, y artefactos que lleven a confusión en el análisis cualitativo de los ácidos. Algunos estudios realizados (Sheppard e Iverson, 1975, Bannon y col, 1982a y b) concluyen que no hay un método ideal entre todos los propuestos, pero que a la vez son todos igualmente apropiados si se realizan correctamente.

Varios investigadores han indicado que los reactivos que se fundamentan en la utilización de bases de alcalinos son los más indicados para un mejor análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases (Bannon y col., 1982a; 1982b; Craske y Bannon, 1987; Craske y col., 1988). El método de la potasa metanólica es muy empleado para la transesterificación de los acilgliceroles en ésteres metílicos. El empleo de este reactivo tiene la ventaja de la rapidez y sencillez y de que la reacción puede transcurrir a temperatura ambiente, en tales condiciones la reacción transcurre cuantitativamente en 20 min, siempre que no haya una gran cantidad de ácidos (Utrilla y col., 1976) y sin problemas de isomerización. El colesterol y los esfingolípidos necesitan condiciones más drásticas para la isomerización (Christie, 1982). La reacción ha de llevarse en medio anhidro, normalmente heptano, para evitar la hidrólisis de los metilésteres y la consecuente liberación de los ácidos grasos, ya que esto resultaría en una cuantificación por defecto y a temperatura ambiente para que no haya conjugación de las insaturaciones.

En cualquier caso, el método establecido ha de seguirse estrictamente para conseguir una reproducibilidad y repetividad de éste. Se tendrá en cuenta la temperatura de los disolventes de extracción, la agitación manual o con instrumentos como un generador de ultrasonidos o un *vortex* y cualquier paso en el método que suponga una variación en la solubilidad o volatilización de los compuestos. La adecuación del método deberá probarse primero con patrones de ácidos grasos de cadena corta o insaturada, que son los que ofrecen resultados más variables y más difíciles de reproducir.

#### 2.1.7.2. Sistema cromatográfico

La elección de la polaridad de la fase estacionaria de una columna capilar de sílice fundida es un factor importante de cara a obtener una buena resolución de los picos y una fácil y rápida identificación de éstos en análisis de rutina. Sin embargo, no constituye éste un factor decisivo, como ocurre en las columnas de relleno, ya que, independientemente de la polaridad de la fase los resultados suelen ser bastante satisfactorios cuando el resto de condiciones del análisis se han optimado. El número de las diversas fases estacionarias es bajo si lo comparamos con la mayor diversidad de fases para las columnas rellenas, este hecho se debe a que cubre todas las necesidades de los análisis de los ácidos grasos (Sidisky y Ridley, 1991). Se debe considerar que, si los resultados lo permiten, son preferibles las fases de menor polaridad, ya que suelen ser de más larga vida y más resistentes que las de mayor polaridad, como pueden ser las metilsiliconas.

La elución de los ésteres metílicos en las columnas con fases apolares sigue un orden de acuerdo con el punto de ebullición, eluyendo en primer lugar los ésteres de menor punto de ebullición y por último los que lo poseen mayor. Los derivados insaturados eluyen justo antes de los saturados de misma longitud.

La gran desventaja de las fases apolares es la mala resolución en la separación de ácidos insaturados; por ejemplo, la elución de los ácidos oleico, linoleico y linolénico puede verse solapada entre sí, lo mismo puede ocurrir con ácidos de 20 y 22 carbonos en la cadena. Esto hace preferible utilizar fases de mayor polaridad, sobre todo teniendo en cuenta la gran importancia que tienen estos ácidos en la composición de los alimentos y de la leche entre ellos. Las fases estacionarias que actualmente cuentan con más interés son las de polaridad intermedia, como los polietilenglicoles. Su aplicación destaca para el análisis de alimentos de origen marino, dada la gran resolución que ofrecen en la separación de los distintos isómeros de ácidos grasos insaturados (Ackman, 1986).

En las fases polares o de polaridad media el orden de elución es por punto de ebullición cuando se trata de ácidos grasos de cadena saturada lineal, posteriormente eluyen los ácidos insaturados de igual longitud por orden ascendente de número de insaturaciones. Los ácidos con dobles enlaces conjugados eluyen después de sus correspondientes no conjugados. Los ácidos ramificados eluyen a tiempos más cortos que sus correspondientes lineales, tanto más cuanto más cerca del carbono  $\omega_1$  esté la ramificación, y para ramificaciones iguales (Ackman, 1986).

El sistema de detección más ampliamente utilizado es el FID (flame ionization detector) o de ionización de llama. Existen otros tipos de detectores más completos, pero los datos que se aportan pueden ser innecesarios e insuficientes; tal es el caso de la espectrometría de masas, que sólo con gran experiencia permite diferenciar isómeros insaturados en lo que se refiere a la posición y configuración del doble enlace y además posee una menor sensibilidad que el detector de ionización de llama.

Respecto a la grasa láctea y sus derivados hay que resaltar que, quizás, son las grasas que más variedad de compuestos presentan; siendo las que suponen un mayor reto para el análisis de los lípidos que contienen. Los ácidos grasos van desde 2 hasta 26 átomos de carbono, saturados, mono y poliinsaturados, con isómeros *cis* y *trans* conjugados o no, y ácidos lineales y ramificados. Para muestras en las que solamente sea necesario identificar y cuantificar los ácidos grasos esterificados, como triglicéridos en su mayoría, se prefiere utilizar columnas de polaridad intermedia, dando muy buenos resultados (De Jong y Badings, 1990). Christie (1989) resalta que la importancia económica de la grasa láctea ha sido en parte importante causante del avance producido en el análisis de sus componentes. Así, ha sido posible la identificación de 437 ácidos grasos diferentes, siendo unos pocos de ellos de interés nutricional y únicamente entre 20 y 30 de ellos son de mayor interés para los analistas. También señala que pueden presentarse problemas de cara a la buena separación de los compuestos, pero las mayores dificultades aparecen en la cuantificación. Los problemas son un conjunto de los mencionados anteriormente y son

principalmente: una transesterificación completa sin pérdidas de compuestos, la introducción de la muestra en la columna evitando discriminaciones en las pérdidas de compuestos en la división de flujo y recomienda que la programación de temperatura sea tal que los componentes de la muestra emerjan a intervalos de tiempo aproximadamente iguales.

### ***2.1.8- Análisis de los triglicéridos por cromatografía líquida de alta eficacia***

La técnica de HPLC en fase inversa no acuosa tiene una serie de ventajas en el análisis de triglicéridos sobre otras técnicas cromatográficas. Estas ventajas hacen cada vez más del HPLC la técnica de elección en el análisis de los triglicéridos y son las siguientes (Hamilton, 1986):

(a) existe la posibilidad de separar los triglicéridos sin necesidad de formar derivados ni de que se descompongan por causa de altas temperaturas, como ocurre en los análisis por cromatografía de gases;

(b) se cuantifican de modo más sencillo que en cromatografía en capa fina;

(c) una vez separados, los componentes de la mezcla pueden recogerse para continuar con análisis posteriores.

El análisis de los triglicéridos de la grasa láctea supone el mayor reto en lo que se refiere al análisis de triglicéridos ya que es la muestra de origen natural más compleja. Patton y Jensen (1975) ya señalaron que debido a la compleja composición de los ácidos grasos de la grasa láctea, podrían existir  $64 \times 10^6$  especies distintas de triglicéridos. Si consideramos solamente alrededor de 20 de los ácidos grasos más abundantes podría

haber 8000 especies moleculares de triglicéridos, incluyendo los isómeros posicionales. Es por esto por lo que una muy buena separación por HPLC no consiga a veces separaciones de especies únicas, sino, más bien, de moléculas de triglicéridos semejantes (Christie, 1987).

Los primeros estudios que establecieron las bases de la investigación tal como se lleva a cabo actualmente en lo referido a separación de triglicéridos por HPLC en fase inversa no acuosa fueron realizadas por Wada y col. (1977, 1978). En estos estudios se pueden destacar dos contribuciones:

(a) la caracterización individual de cada especie molecular de triglicérido por medio de lo que se denominó número de partición (NP), siendo,

$$NP = NC - 2 \times ND \quad (2.1)$$

donde NC = número de carbonos del triglicérido, exceptuando los del glicerol,

ND = número de dobles enlaces,

(b) el establecimiento de una relación entre el NP de cada triglicérido y el factor de capacidad  $k'$  de cada uno de los picos del cromatograma.

De este modo dedujeron que los triglicéridos eluyen en orden ascendente de NP y que para triglicéridos con un mismo NP eluyen primero los de mayor ND.

El número equivalente de carbonos (NEC) fue definido por Herslöf y col. (1979) según la siguiente ecuación:

$$NEC = NC - a' \times ND \quad (2.2)$$

siendo  $a'$  un valor próximo a 2 dependiente del sistema cromatográfico.

Aún así, aparecen pares críticos de triglicéridos que poseen los mismos NEC y ND, constituyendo un problema en la identificación de las especies. Las mezclas complejas de triglicéridos, cuyo intervalo de NEC es amplio, son difíciles de analizar por métodos isocráticos, por lo que generalmente se realizan mediante gradiente de polaridad (Robinson y Macrae, 1984; Barrón y col., 1990).

#### 2.1.8.1. Sistema cromatográfico

El detector de masa o de luz difundida ha sido introducido recientemente en el análisis de triglicéridos. Se basa en la evaporación de la fase móvil y la medida de la luz reflejada y refractada por las partículas sólidas de soluto que se forman. La ventaja principal de este detector es que se puede utilizar con gradientes de polaridad, hecho que no era posible con el detector de índice de refracción y complicado con el ultravioleta, si bien, la sensibilidad es menor que la del detector UV (Christie, 1991).

La composición de la fase móvil puede variar según el tipo de triglicéridos que se vayan a analizar y según otras condiciones cromatográficas, como puede ser el tipo de detector a emplear. Generalmente se utilizan disolventes no acuosos (Barrón y Santa-María, 1987). En lo que se refiere a la fase estacionaria influye la polaridad de la fase, tamaño de partícula y longitud de columna. De las columnas estudiadas, las de octadecilsilíce son las de mejores resultados (Goiffon y col., 1981; Podhala y Töregard, 1982; Deffense, 1984; Barrón y col., 1987).

#### 2.1.8.2. Análisis cuali-cantitativo

Una dificultad a la hora del análisis cualitativo de la muestra se debe a que existen pocos triglicéridos mixtos en estado puro que puedan ser utilizados como patrones para la

identificación. Para realizar esta identificación de las especies moleculares de triglicéridos separados por HPLC se han estudiado relaciones entre el tiempo de retención y el número de partición (Wada y col., 1977; 1978), el número equivalente de carbonos (Hersl f y col., 1979, Frede, 1986), y la longitud de cadena equivalente (Goiffon y col., 1981), según la cual existe una relación lineal entre el  $\log k'$  y las longitudes e insaturaciones de cada ácido graso integrante de cada triglicérido, cumpliéndose que:

$$\log k' = K + c_{lA} l_A - c_{dA} d_A + c_{lB} l_B - c_{dB} d_B + c_{lC} l_C - c_{dC} d_C \quad (2.3)$$

siendo  $K$  la ordenada en el origen,

$A, B$  y  $C$  los ácidos grasos componentes del triglicérido,

$l$  la longitud de cadena de cada ácido graso,

$d$  el número de dobles enlaces de cada ácido graso,

$c_{ij}$  los coeficientes de cada variable independiente,

El método de El-Hadmy y Perkins (1981) se basa en el cálculo del TCN (número teórico de carbonos). Éste puede ser determinado para cualquier triglicérido a partir de la regresión lineal del  $\log k'$  frente al NC de su correspondiente triglicérido saturado por interpolación de su  $\log k'$ . De este modo cualquier triglicérido saturado posee un TCN coincidente con su NC y con su NEC. El factor  $U_i$  se utiliza para calcular el TCN de triglicéridos insaturados y se calcula experimentalmente a partir de la diferencia en el  $NP^*$  de patrones insaturados y sus correspondientes saturados tras la interpolación de su  $\log k'$ . El proceso se lleva a cabo con el cálculo de las siguientes ecuaciones:

$$\log k' = a + bNP_{sat}^* \quad (2.4)$$

$$\log k' = a + bNP_{insat}^* \quad (2.5)$$

$$\sum_1^3 U_i = NP_{sat}^* - NP_{insat}^* \quad (2.6)$$

$$TCN = NP_{sat}^* - \sum_1^3 U_i. \quad (2.7)$$

siendo  $NP^* = NC$  para triglicéridos saturados; en el caso de insaturados se obtiene experimentalmente por interpolación.

Otros trabajos, como el de Takahashi y col. (1988), proponen las siguientes ecuaciones para la estimación de los triglicéridos:

$$\log k'_{AAB} = 2/3 \log k'_{AAA} + 1/3 \log k'_{BBB} \quad (2.8)$$

$$\log k'_{ABC} = 1/3 \log k'_{AAA} + 1/3 \log k'_{BBB} + 1/3 \log k'_{CCC} \quad (2.9)$$

siendo A, B y C los ácidos grasos que componen un triglicérido.

La complejidad de la composición en triglicéridos de la grasa láctea hace que la resolución cromatográfica y el análisis cualitativo sean más difíciles que en otras grasas y aceites. Por ello se realizan acoplamientos entre dos o más técnicas analíticas como son HPLC y GC (Barrón y col, 1990, Maniongui y col., 1991).

En este trabajo se ha conseguido una mejor estimación de la composición en triglicéridos de la grasa láctea por combinación de HPLC y GC, y de modelos matemáticos basados en el cálculo del NEC (a partir de NC y ND, y de NC y ND de cada ácido graso integrante de cada triglicérido), y del propuesto por Takahashi y col. (1988).



### 2.1.9- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ de alta resolución en lípidos

La resonancia magnética nuclear ha tenido un uso muy limitado en el análisis de grasas y aceites naturales hasta recientemente, probablemente debido a la carencia de información básica de la materia y al elevado coste de los equipos.

El uso de la RMN de protón ( $^1\text{H}$ ) ha sido muy limitado por aportar un número pequeño de señales, dando poca información, aunque existen trabajos que utilizan su mayor sensibilidad para la determinación de compuestos minoritarios, como los diglicéridos en aceites vegetales y la combinación con la  $^{13}\text{C}$ -RMN para realizar correlaciones heteronucleares bidimensionales (Sacchi y col., 1991). Otros trabajos se basan en la mejor y rápida cuantificación de la  $^1\text{H}$ -RMN para cuantificar los mono-, di- y triglicéridos por separado a pesar de que puede haber solapamiento de señales o en una rápida caracterización de extractos lipídicos (Sparling y col., 1989; Sze y Jardetzky, 1990; Pollesello y col., 1991). Sin embargo, la  $^{13}\text{C}$ -RMN está adquiriendo importancia, los equipos actuales llegan a ser de 300 MHz o mejores y, a pesar de su coste, son más asequibles, y su mayor resolución es una herramienta más útil para la caracterización de mezclas de triglicéridos (Henderson y col., 1994).

En la tabla 2.1.9 se presentan los desplazamientos químicos de los grupos funcionales más comunes en lípidos (Pretsch y col., 1976; Levy y col., 1980).

**Tabla 2.1.9.** Desplazamientos químicos más comunes en lípidos.

Grupo Funcional	$\delta(\text{ppm})$
$\text{H}_3\text{C}-\text{C}$	0-30
$\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}$	0-30
$\text{C}-\text{C}=\text{C}$	10-40
$\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}$	10-70
$-\text{C}\equiv\text{C}-$	20-100

tabla 2.1.9 (continuación)

C-CH <sub>2</sub> -COX (X:C,O,N)	30-60
C-CH <sub>2</sub> -O	58-92
CH <sub>2</sub> -O-P-O	60-80
>C=C<	80-160
C-COX (X:C,O,N)	165-180
C-COOH	175-185
(continuación)	

Se posee actualmente cada vez más información sobre los desplazamientos químicos usando especies moleculares individuales, como el linolenato de metilo representado en la figura 2.1.9. Esto se puede aplicar a espectros más complejos de muestras naturales (Gunstone, 1993a; 1993c; 1994), aunque la optimización de los parámetros de adquisición y procesado de los espectros para reducir el tiempo de las experiencias, y la comparación de los resultados con los obtenidos por los métodos de rutina aún están en las primeras fases (Sacchi y col., 1992).

### 2.1.9.1- Estudio de la grasa láctea

La grasa láctea tiene como característica el contener ácidos grasos de cadena corta, que producen señales de RMN muy características y diferentes a las de los ácidos de cadena media y larga, además de que su solapamiento suele ser menor. Utilizando los datos de las intensidades puede saberse la composición molar porcentual de los ácidos butírico, caproico, caprílico, monoinsaturados, poliinsaturados, y diferenciar la presencia de isómeros *cis* y *trans*. Existen tablas que aportan datos de desplazamiento químico de los carbonos C1-C3 y  $\omega$ 1- $\omega$ 3 (que son los más defintorios a la hora de distinguir los ácidos grasos de cadena corta) y de otros carbonos de interés en grasa láctea como son los olefinicos y alílicos (Gunstone, 1993b). Este mismo trabajo realiza un análisis de diferentes grasas animales, vegetales y fórmulas infantiles para detectar adiciones de

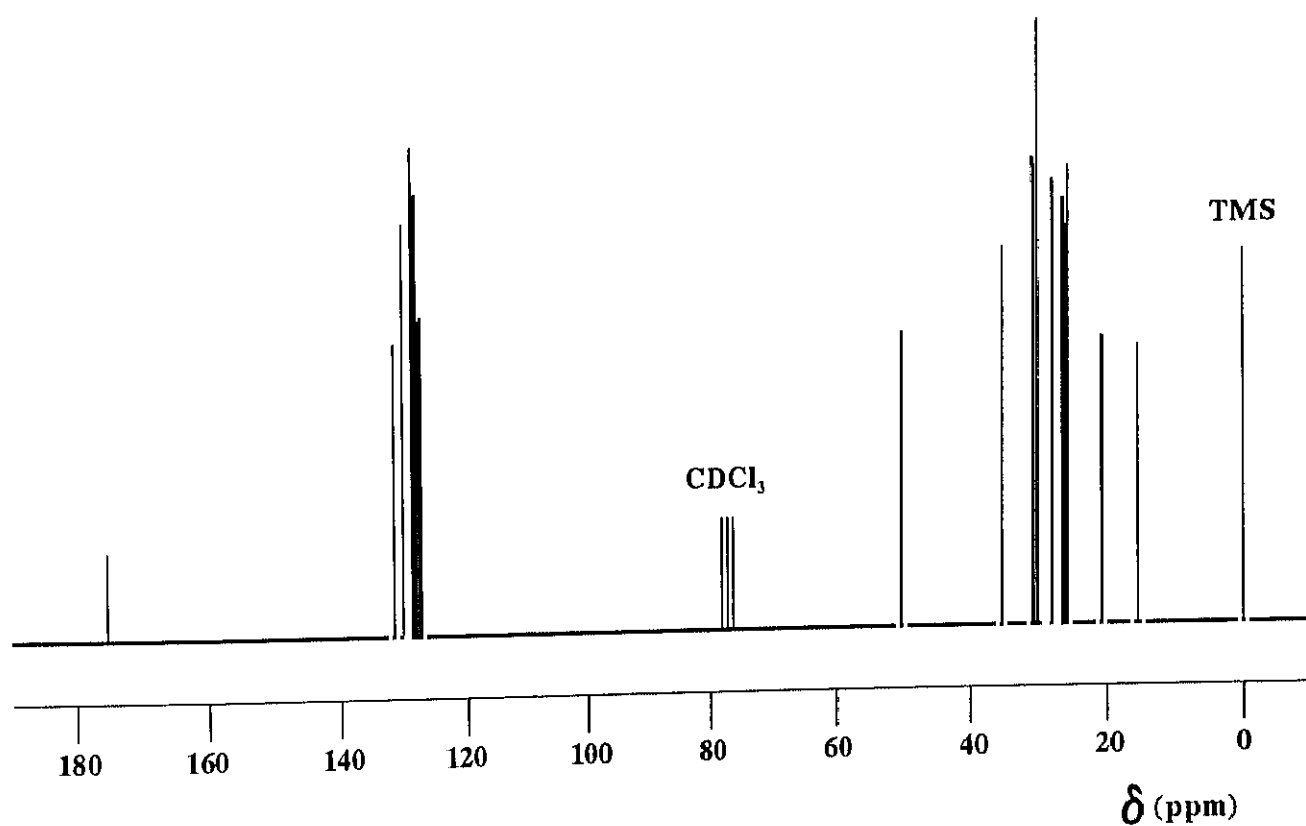


Figura 2.1.9. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del linolenato de metilo en  $\text{CDCl}_3$  con TMS como patrón interno (Christie, 1990). Desplazamientos químicos: C-1, 174,16; C-16, 131,92; C-9, 130,24; C-12/13, 128,29; C-10, 127,8; C-15,127,18; -O-CH<sub>3</sub>, 51,36; C-2, 34,11; C-7,29,63; C-4/5/6, 29,21 a 29,18; C-8, 27,25; C-11, 25,68; C-14, 25,58; C-3, 24,99; C-17, 20,60; C-18, 14,29.

grasa láctea, aceites láuricos, grasa parcialmente hidrogenada y ácidos poliinsaturados, sin embargo presenta los resultados de manera semicuantitativa.

#### 2.1.9.2- Estudio de aceites vegetales

Los compuestos de mayor interés y sencillez de identificación y cuantificación son los ácidos grasos insaturados tras la asignación de los carbonos olefinicos, alílicos y divinilmetilénicos. También se pueden cuantificar los ácidos grasos libres separadamente de los esterificados y los compuestos de la fracción insaponificable. La mayoría de los estudios se han realizado para detectar mezclas de aceites de oliva vírgenes y refinados (Sacchi y col., 1990), determinación de diglicéridos (Sacchi y col., 1991), distribución posicional de los ácidos grasos de los triglicéridos de aceite de oliva (Sacchi y col., 1992), que pretende utilizar la RMN para detectar mezclas de aceites de oliva virgen con aceites esterificados sintéticamente evitando procedimientos químicos para la preparación de la muestra. El trabajo de Zamora y col. (1994) consistió en la caracterización de la fracción insaponificable de aceites de oliva y orujo de oliva, aportando datos sobre los desplazamientos químicos del escualeno, esteroides y alcoholes triterpénicos. Los métodos de resonancia pueden ser muy útiles para usarlos como referencia en métodos enzimáticos de rutina, pero no como métodos de rutina debido a la duración de las experiencias y, sobre todo, al coste requerido de los equipos.

Otros estudios se encaminan a la caracterización de aceites ricos en ácidos grasos de uso en fabricación de pinturas, plásticos, síntesis química o estudios metabólicos, como el trabajo de Neff y col. (1993) para la caracterización de aceites de semillas de *Vernonia galamensis* y *Crepis alpina*, ricos en ácidos vernólico y crepénico respectivamente.

### 2.1.9.3- Estudio de aceites de pescado

Los aceites de pescados más estudiados han sido los de salmón (Aursand y col., 1993) y atún (Sacchi y col., 1993), ya que son ricos en ácidos eicosapentaenoico y docosaheptaenoico, ácidos grasos poliinsaturados de la familia (n-3). Estos ácidos grasos presentan señales con desplazamientos químicos característicos en las regiones olefinicas y carbonílicas, y al presentarse en alta cantidad pueden ser cuantificados y comparados satisfactoriamente con métodos convencionales de análisis como la GC. Sacchi y col. (1993) además realizan una caracterización del aceite del atún y cuantifican los ácidos grasos libres, la distribución posicional  $\alpha$ - $\beta$  de los ácidos grasos poliinsaturados esterificados a glicerol y la concentración de fosfolípidos.

## ESTIMACIÓN DE LA COMPOSICIÓN EN TRIGLICÉRIDOS DE LA GRASA LÁCTEA

### 2.2- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.2.1- Preparación de la muestra

La leche cruda de oveja fue proporcionada por el Complejo Agropecuario de la Comunidad de Madrid situado en Aranjuez.

La extracción de la nata se lleva a cabo calentando la leche en un baño de agua a 35-40 °C durante 20-30 min. Posteriormente, la nata se separa por centrifugación a 20 °C durante 30 min a 3000 r.p.m.. Los tubos que contienen la leche centrifugada se ponen en un baño de hielo hasta que la nata se ha solidificado, recogiendo y guardándose en congelador a -20 °C hasta su posterior análisis.

La extracción de los triglicéridos se llevó a cabo según un trabajo de Barrón y col. (1990). Un gramo de nata se deposita en un matraz al que se añade el disolvente de extracción *n*-hexano (Panreac), conteniendo BHT (Fluka) como antioxidante en una concentración de 0.1 mg/mL, en una relación de 10/1 (mL/g). La mezcla se homogeniza en un baño de ultrasonidos y se introduce en un embudo de decantación, al que se añade etanol (Panreac)-agua destilada (80:20, vol/vol) en una relación 3/2 respecto al volumen de *n*-hexano utilizado. La mezcla se agita energicamente y se deja reposar hasta la completa separación de las fases. La inferior, hidroalcohólica, se lava dos veces con *n*-hexano. Los lavados con hexano se añaden a la fase orgánica inicial.

La fracción orgánica se filtra con papel Wathman 1PS y se concentra a sequedad en corriente de nitrógeno. El residuo triglicérico (alrededor de 0,50 g) se redisuelve en 2 mL de hexano y se filtra a través de membrana de tamaño de poro 0,2 µm. Se inyectan 10 µL

de la disolución para el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia. Para la recogida de fracciones a la salida de la columna se inyectaron volúmenes de 20  $\mu\text{L}$ .

### ***2.2.2- Análisis de triglicéridos de grasa láctea por cromatografía líquida de alta eficacia***

El método de cromatografía líquida de alta eficacia utilizado para el análisis de los triglicéridos se basó en uno previamente desarrollado por Hierro y col. (1992) y Hierro (1994). El sistema cromatográfico utilizado consistió en dos bombas modelo 125 (Beckman), un inyector Rheodyne modelo 7125 con un bucle de carga de 10  $\mu\text{L}$ , se utilizaron dos columnas de acero inoxidable de 25 cm y 15 cm  $\times$  4,6 mm de d.i. rellenas con Spherisorb ODS-2 de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro (Phase Separations, Symta) conectadas en serie y termostatzadas en un baño de agua a una temperatura de 30 °C. Se utilizó un detector de masa (ACS 750/14, The Arsenal) con una temperatura en el evaporador de 45 °C y 138 kPa de presión de aire. El aire a presión era proporcionado por un compresor (Air Control) y posteriormente secado por dos trampas de agua. Los vapores formados en el detector eran eliminados mediante un extractor. La detección de patrón de tributirina para el estudio del NEC se realizó bajando la temperatura del evaporador del detector hasta 20 °C.

La fase móvil consistió en una elución en gradiente desde 0 a 70% (vol/vol) de acetona en acetonitrilo (ambos de grado HPLC) en dos etapas: un inicial aumento lineal de 0,7%/min en acetona durante 50 min seguido de elución isocrática durante los siguientes 20 min, y un segundo aumento lineal de 0,7%/min de acetona en acetonitrilo seguido también de una elución isocrática de 42 min hasta el final del análisis. El flujo empleado fue de 0,9 mL/min y la presión de 17,2 MPa. El gradiente y la adquisición de datos provenientes del detector se controlaron con el programa System Gold (Beckman) a través de una interfase modelo 406 (Beckman).

### ***2.2.3- Recogida de fracciones***

La recolección de fracciones a la salida del sistema cromatográfico fue necesaria para realizar un posterior análisis de ácidos grasos tras la separación por HPLC, con el fin de identificar las especies moleculares mayoritarias de triglicéridos. El carácter destructivo del detector de masa hizo necesario la toma de fracciones en un punto anterior a éste y su cronometración basándose en inyecciones previas, puesto que no es posible la adquisición de datos.

Las fracciones se recogieron cada 40 s a la salida de la columna a partir del minuto 14 (ya que anteriormente a este tiempo no hay todavía elución de compuestos), de tal forma que no hubo recogida de más de un pico cromatográfico estrecho por fracción y que picos anchos pudieron ser recogidos en fracciones sucesivas.

En total se recogieron 227 fracciones de HPLC conteniendo triglicéridos disueltos en la fase móvil. Estas fracciones se guardaron en congelador hasta su análisis por cromatografía de gases.

### ***2.2.4- Análisis de los ácidos grasos de triglicéridos de fracciones HPLC por cromatografía de gases***

#### **2.2.4.1- Preparación de la muestra**

Los triglicéridos separados mediante HPLC y recogidos en fracciones se hidrolizaron para analizar sus ácidos grasos constituyentes como ésteres metílicos (FAME).



Los triglicéridos contenidos en las diferentes fracciones se depositaron en viales de fondo cónico de 1 mL de capacidad para favorecer la concentración de la muestra y se llevaron a sequedad por evaporación de la acetona y acetonitrilo mediante una corriente de nitrógeno.

La preparación de la muestra fue una modificación de los métodos descritos por Utrilla y col. (1976) y Barrón y col. (1990). El método se basa en la formación de ésteres metílicos de los ácidos grasos, derivados volátiles en las condiciones de análisis. Las modificaciones realizadas tuvieron como fines una mayor concentración de la muestra en el disolvente de inyección y alargar el tiempo de inyección hasta 100 min. En el vial cónico conteniendo los triglicéridos se adicionaron 20  $\mu$ L de *n*-heptano (Merk) y 10  $\mu$ L de KOH 2N en metanol. La mezcla se agitó en ultrasonidos durante 1 min. Se inyectó 0,1  $\mu$ L de la fase heptánica conteniendo FAME tras 20 min.

La tripelargonina se utilizó como patrón interno ya que ésta no era detectada en los análisis de las muestras.

#### 2.2.4.2- Sistema cromatográfico

El análisis de los ácidos grasos de los triglicéridos de las fracciones recogidas se realizó en un cromatógrafo de gases HRGC 5160 Mega Series (Carlo Erba) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un inyector con posibilidad de división de flujo (*split/splitless*).

Se utilizó una columna de sílice fundida de 24 m  $\times$  0,23 mm de d.i. recubierta con SP-1000 (Supelco), cuyo espesor de fase era de 0,25  $\mu$ m. Como gas portador se utilizó N<sub>2</sub> a 40 kPa de presión. Las condiciones fueron las siguientes: inyector a 275 °C, detector a 250 °C, temperatura inicial de la columna 40 °C mantenidos durante 4 min, seguida de

una rampa de temperatura de 10 °C/min hasta alcanzar los 150 °C, y otra de 2 °C/min hasta 200 °C y esta temperatura se mantuvo durante 60 min hasta el final del análisis. Los cromatogramas y los resultados se procesaron mediante un integrador Spectra-Physics modelo Data Jet.

La duración del análisis permitió la buena separación de los ácidos grasos de la muestra ya que la mayor sensibilidad del equipo utilizado permitió la detección de ácidos grasos minoritarios como los ramificados, los de cadena impar y los isómeros de linoleico y linolénico.

La pequeña cantidad en la que se encontraban los triglicéridos a la salida de la columna del HPLC hizo necesaria la inyección sin división de flujo (*splitless*) y su mantenimiento durante 20 s para permitir la entrada de la totalidad de la muestra en la columna. Tras este tiempo el flujo de split fue de 40 mL/min.

#### 2.2.4.3-Análisis cualitativo

La identificación de los ácidos grasos que constituían los triglicéridos de las distintas fracciones de HPLC se llevó a cabo mediante la comparación de los tiempos de retención con los obtenidos en el análisis de una mezcla de patrones de ácidos grasos. La identificación de ácidos grasos ramificados, de cadena impar y los insaturados minoritarios no fue posible con patrones y se recurrió a la bibliografía existente (Antila y Kankare, 1983; De Jongs y Badings, 1990).

Los patrones utilizados tenían una pureza de aproximadamente del 99% y fueron los siguientes:

- ésteres metílicos de los ácidos butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y araquídico (PolyScience Corporation),

- ésteres metílicos de los ácidos *trans*-vaccénico y  $\alpha$ -linolénico (Sigma Chemical).

#### 2.2.4.4- Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

Para el análisis por GC/MS se inyectaron muestras de triglicéridos de grasa de leche de oveja con el fin de confirmar la identificación de ácidos grasos de asignación dudosa. Sin embargo, algunos estudios, como el de Christie (1989) indican que no siempre los derivados metílicos son indicados para la identificación mediante la MS, además insiste en que ésta sea la técnica espectroscópica más dependiente de la experiencia del investigador para la identificación de estructuras moleculares y que no hay reglas estrictas en la rotura de las moléculas. Christie también señala que, en el caso de la elucidación de ácidos grasos insaturados, no se forman iones que sirvan de indicación para la localización o estereoquímica de los dobles enlaces en los isómeros de posición, debiéndose a una posible migración de éstos cuando se forma el ion molecular y dando numerosos productos intermedios y consiguientemente iones muy diversos. En el caso de los ácidos poliinsaturados, sus espectros ofrecen iones con varias intensidades, pero no puede decirse que sirvan para la interpretación de la posición de los dobles enlaces. Normalmente, se considera que la ventaja de la GC/MS se debe a que aporta datos sobre los pesos moleculares de los compuestos junto a los de los tiempos de retención, lo que se puede considerar bastante satisfactorio. La dificultad en la identificación se extiende también a los ácidos grasos de cadena ramificada, y sobre todo a la hora de discernir entre isómeros *iso* y *anteiso*.

La preparación de la muestra consistió en la extracción de triglicéridos por el método descrito en el apartado 2.2.1 y posterior formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos según el apartado 2.2.4.1.

El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases 5890 Series II acoplado a un espectrómetro de masas 5971A, ambos Hewlett-Packard. Las condiciones del método de inyección fueron las mismas utilizadas en el apartado 2.2.4.2 excepto que el gas portador utilizado fue helio.

#### 2.2.4.5- Análisis cuantitativo

La cuantificación de los ácidos grasos se realizó siguiendo la técnica del patrón interno. Se utilizó tripelargonina como patrón debido a que ésta no se encontraba en cantidades detectables en las muestras inyectadas y a que era el compuesto de estructura más semejante a los ácidos grasos de cadena corta, y por tanto más volátiles, presentes en la leche (butírico, caproico y caprílico).

Asimismo, también se observó que se producían menores respuestas de los ácidos grasos insaturados, por lo que se decidió utilizar otro patrón interno para su cuantificación. Se tomó el propio ácido palmítico de la muestra como patrón interno de estos compuestos ya que en la zona de elución próxima no era posible utilizar ningún compuesto inexistente en la muestra sin que coeluyese con los ya presentes. Además, el ácido palmítico es el más abundante en la leche, por lo que quedaba asegurada su presencia en la mayoría de fracciones de HPLC y prácticamente no sufría modificaciones durante la preparación de la muestra o inyección, por lo que se consideró que tenía un factor de respuesta ( $F_r$ ) de 1 respecto al ácido pelargónico.

Del mismo modo, se asignó al patrón interno y resto de ácidos grasos presentes en la muestra (ácidos grasos de cadena media y larga saturados lineales y ramificados) un  $F_r = 1$ .

Para el cálculo del factor de respuesta de los ácidos grasos de cadena corta o insaturada se prepararon soluciones patrones de los siguientes compuestos en las siguientes cantidades:

- 150 µg/mL de tripelargonina y tripalmitina,
- 10, 15, 50, 75, 100, 150, 225 y 300 µg/mL de tributirina, tricaproína, tricaprлина, trioleína, trilinoleína y trilinolenina.

Las soluciones se inyectaron 5 veces y se procedió al cálculo del factor de respuesta y la desviación estándar relativa. El factor de respuesta se definió como:

$$F_{ri} = \frac{C_i \cdot A_{PI}}{C_{PI} \cdot A_i} \quad (2.10)$$

siendo:

$F_{ri}$  el factor de respuesta del compuesto  $i$ ,

$C_i$  la concentración del compuesto  $i$ ,

$C_{PI}$  la concentración del patrón interno,

$A_i$  el área del compuesto  $i$ ,

$A_{PI}$  el área del patrón interno.

### 2.2.5- Desarrollo de modelos matemáticos

Se inyectaron en el HPLC y por quintuplicado soluciones de los siguientes patrones: tributirina, tricaproína, tricaprлина, tripelargonina, tricaprina, trilinolenina, trimiristoleína, trilaurina, 1,2-dilauroil-3-miristina, tritridecanoína, 1,2-dimiristoil-3-laurina, trilinoleína, tripalmitoleína, trimiristina, 1,2-dilinoleoil-3-oleína, 1,2-miristoil-3-oleína, 1,2-dimiristoil-3-palmitina, tripentadecanoína, 1,2-dipalmitoil-3-miristina, trioleína, 1,2-dioleoil-3-palmitina, 1,2-dipalmitoil-3-oleína, tripalmitina, 1,2-dioleoil-3-estearina, 1-

estearoil-2-oleoil-3-palmitina, 1,2-diestearoil-3-miristina, trimargarina, 1,2-diestearoil-3-oleína, 1,2-diestearoil-3-palmitina y triestearina.

La inyección de estos patrones permitió el cálculo del factor de capacidad ( $k'$ ) a partir de sus tiempos de retención ( $t_r$ ) y el tiempo muerto ( $t_0$ ).

A partir de estos datos y del número de carbonos, NC, y número de dobles enlaces, ND, de cada triglicérido arriba indicado se realizó un análisis de regresión lineal múltiple (ecuación 12) mediante el programa 1R de BMDP (Statistical Software Inc.). Posteriormente se calculó el NEC de los triglicéridos puros utilizados como patrón (ecuación 14) y por último se realizó otro análisis de regresión lineal de  $\log k'$  en función del NEC (ecuación 15) (1R BMDP). Los cálculos a seguir fueron los siguientes:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}; \quad (2.11)$$

$$\log k' = a + bNC + cND; \quad (2.12)$$

$$a' = \frac{c}{b}; \quad (2.13)$$

$$NEC = NC + a'ND; \quad (2.14)$$

$$\log k' = d + eNEC \pm EE; \quad (2.15)$$

siendo EE el error estándar de la regresión.

Se puede estimar el  $k'$  de un triglicérido dado y viceversa, el NEC que corresponde a un pico.

Debido a que al realizar un análisis de regresión siempre se produce un error (EE) se decidió calcular un NEC máximo y un NEC mínimo que delimitaran un intervalo para un valor de  $k'$ :

$$NEC_{min} = \frac{\log k' - d - EE}{e}; \quad (2.16)$$

$$NEC_{max} = \frac{\log k' - d + EE}{e}; \quad (2.17)$$

Se aplicaron también los modelos desarrollados por Takahashi y col. (1988), lo que obligó a la inyección de patrones de triglicéridos heterogéneos y homogéneos. Se utilizaron los tiempos de retención de los patrones en el análisis por regresión lineal (1R BMDP) para conseguir el cumplimiento de las siguientes ecuaciones:

$$\log k'_{AAB} = 2/3 \log k'_{AAA} + 1/3 \log k'_{BBB}; \quad (2.18)$$

$$\log k'_{ABC} = 1/3 \log k'_{AAA} + 1/3 \log k'_{BBB} + 1/3 \log k'_{CCC}; \quad (2.19)$$

Los patrones utilizados fueron los recogidos en la tabla 2.2.4.5.

**Tabla 2.2.4.5.** Triglicéridos puros utilizados como patrones para el desarrollo de los modelos de Takahashi y col. (1988).

		AAA	BBB	CCC
<b>AAB</b>	LaLaM	LaLaLa	MMM	
	MMLa	MMM	LaLaLa	
	LLO	LLL	OOO	
	MMO	MMM	OOO	
	MMP	MMM	PPP	
	PPM	PPP	MMM	
	OOP	OOO	PPP	
	PPO	PPP	OOO	
	OOS	OOO	SSS	
	SSM	SSS	MMM	
	SSO	SSS	OOO	
	SSP	SSS	PPP	
<b>ABC</b>	OPS	OOO	PPP	SSS

Los triglicéridos del aceite de soja están perfectamente caracterizados (Barrón, 1989), ya que posee únicamente 14 especies moleculares detectables mediante el método de HPLC utilizado. De los 12 triglicéridos heterogéneos, 4 poseen los tres ácidos grasos distintos. Por tanto, se realizaron inyecciones de aceite de soja, del mismo modo que la inyección de patrones, para obtener más datos que proporcionaran mejores resultados.

También se desarrolló el método de Goiffon y col. (1981) para el cálculo de la longitud de cadena equivalente. De este modo se pretendió obtener el mayor número de modelos posibles que apoyasen y facilitasen la estimación de los triglicéridos.

Se inyectaron mezclas de patrones de FAMES (PolyScience Corporation) en el HPLC con el fin de establecer una relación entre los tiempos de retención de estos ésteres y de los triglicéridos y sus constantes moleculares mediante el programa 1R (BMDP) de regresión



lineal múltiple. Los patrones se disolvieron en acetona y se inyectaron por triplicado cada una de las disoluciones siguientes:

- FAMES de C4:0, C6:0, C7:0, C8:0, C9:0, C10:0, C11:0, C12:0 y C14:0,
- FAMES de C16:0, C18:0, C18:1 (O), C18:2 (L), C18:3 (Ln), C20:0 y C22:0 disueltos al 10% en etilbenceno,
- mezclas de ambas disoluciones.

Se intercaló un detector UV (LDC Analytical) a 210 nm entre la columna de HPLC y el detector de masa para mejorar la detección de los FAMES más volátiles. Sin embargo, fue necesario el uso del detector de masa para la detección de los FAMES de mayor peso molecular porque el gradiente de acetona producía una fuerte deriva de la línea base en el detector UV.

#### *2.2.6- Estimación de la composición en triglicéridos de la grasa de leche de oveja*

La composición en triglicéridos se estimó según una modificación del método descrito por Barrón y col. (1990), basado en el cálculo del NEC a partir de los  $k'$  de los picos cromatográficos de HPLC y en la composición molar en ácidos grasos en cada fracción recogida a la salida de la columna y analizada por GC y teniendo en cuenta que las tres posiciones de los ácidos grasos en el glicerol son equivalentes, hecho que se justifica porque el análisis por HPLC no separa isómeros de posición (Bailey, 1951; Herslöf y Kindmark, 1985; Perrin y Prévot, 1986).

Para el tratamiento de los datos en la estimación de la composición los triglicéridos se creó un programa informático en lenguaje QuickBasic (Anexos I y II), en el que a partir de los datos de áreas de los ácidos grasos presentes en cada fracción y los NEC

correspondientes a cada tiempo se obtuvieron los triglicéridos posibles en mayor proporción en cada fracción.

#### *2.2.7- Comparación de la composición en triglicéridos de la grasa de leche de oveja, cabra y vaca.*

La leche cruda de vaca (1 muestra de 250 mL) para el estudio de comparación fue proporcionada por la granja diplomada La Chirigota, en Villanueva del Pardillo (Comunidad de Madrid); la leche cruda de cabra (1 muestra de 250 mL) se obtuvo de la granja Queserías Ibéricas, en Fuenlabrada (Comunidad de Madrid). La leche oveja se obtuvo según se explica en el apartado 2.2.1.

La fracción triglicérica de la leche de las tres especies animales se extrajo del modo indicado en el apartado 2.2.1 y posteriormente se realizó un análisis por HPLC según se ha indicado previamente en el apartado 2.2.2.

La aplicación del programa de desconvolución de picos permitió que éstos fueran agrupados de acuerdo con sus constantes moleculares. Las especies moleculares se agruparon según su NEC en  $NEC \leq 34$ ;  $34 < NEC \leq 40$  y  $NEC > 40$ .

## 2.3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *2.3.1- Análisis de los ácidos grasos de triglicéridos de fracciones de HPLC por cromatografía de gases*

#### 2.3.1.1- Análisis cualitativo

El análisis de los ácidos grasos de la grasa láctea por cromatografía de gases permitió la separación e identificación de 43 especies moleculares distintas (figura 2.3.1.1). Con estos resultados se destaca el gran número de distintos ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos de la grasa de la leche, hecho que dificulta la identificación de estos últimos. Los ácidos grasos mayoritarios son los de cadena saturada par junto con oleico y linoleico, pero también se detectaron ácidos grasos de cadena impar, tanto saturados como insaturados, ramificados, e isómeros de los ácidos oleico, linoleico y linolénico. Suponiendo que los ácidos grasos se esterificaran al azar a la molécula de glicerol, las especies posibles serían  $43^3 = 79.507$ .

#### 2.3.1.2- Análisis por GC/MS

Los resultados obtenidos mediante el análisis de los ácidos grasos por GC/MS sirvieron para confirmar la identificación de algunos ácidos grasos de asignación dudosa, en especial los ácidos de 19 y 20 carbonos y los insaturados de 18. El ion molecular del espectro de masas nos aportó información sobre los pesos moleculares de los diferentes compuestos, de este modo se pudo averiguar sin ninguna duda el número de carbonos y de insaturaciones de los ácidos antes mencionados. Sin embargo, no fue posible determinar la posición de los dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada ni su isomería *cis-trans*.

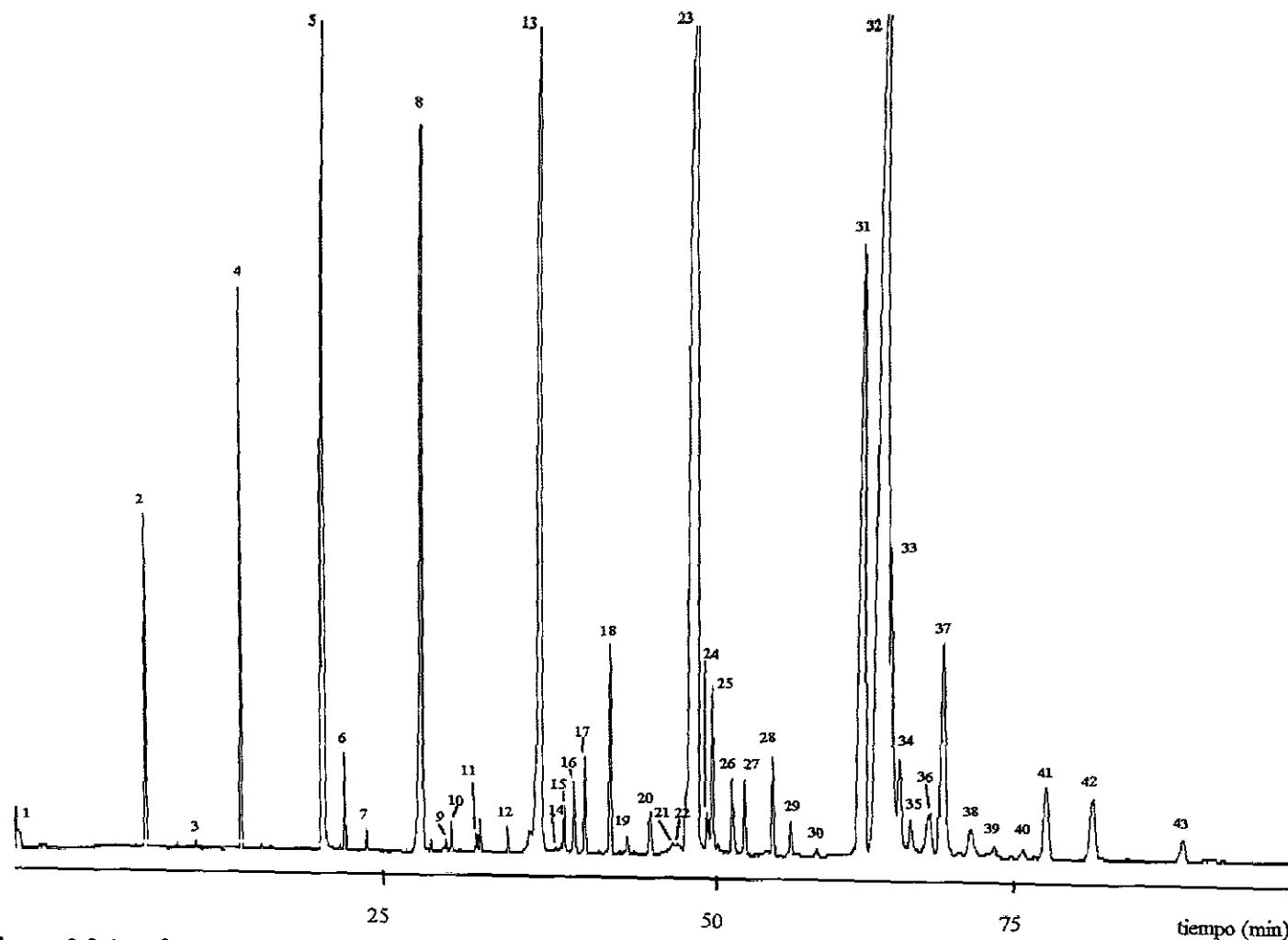


Figura 2.3.1.1. Composición en ácidos grasos de la leche de oveja analizados por cromatografía de gases. 1: 4:0 (Bu), 2: 6:0 (Co), 3: 7:0, 4: 8:0 (Cl), 5: 10:0 (Ca), 6: 10:1, 7: 11:0, 8: 12:0 (La), 9: 12:1, 10: 12:1, 11: 13:0, 12: *i*-14:0, 13: 14:0 (M), 14: 14:1, 15: 9*c*-14:1 (Mi), 16: *i*-15:0 (*i*Pd), 17: *ai*-15:0, 18: 15:0 (Pd), 19: 15:1, 20: *i*-16:0, 21: *br*-16:0, 22: *br*-16:0, 23: 16:0 (P), 24: 16:1, 25: 9*c*-16:1 (Pa), 26: *i*-17:0 (*i*Ma), 27: *ai*-17:0 (*ai*Ma), 28: 17:0 (Ma), 29: 17:1, 30: *i*-18:0, 31: 18:0 (S), 32: 9*c*-18:1 (O), 33: 11*t*-18:1 (V), 34: 18:1, 35: 18:1, 36: 18:2, 37: 9*c*,12*c*-18:2 (L), 38: 18:2, 39: 19:0, 40: 19:1, 41: 9*c*,12*c*,15*c*-18:3 (Ln), 42: *ct*-18:2 conjugado, 43: 20:0.

La utilización de helio como gas portador en el método desarrollado, que utiliza nitrógeno, produjo una disminución de los tiempos de retención y por ello la resolución empeoró; no obstante, el número de picos y su orden de elución no varió.

En la figura 2.3.1.2a se presenta un cromatograma de la corriente total de iones (TIC) obtenido mediante el análisis GC/MS, en él aparecen los ésteres metílicos de los ácidos grasos. En la mayoría de los casos fue posible la completa caracterización de los compuestos, gracias a la comparación con patrones, sin embargo, en el resto solamente pudo obtenerse información de sus números de carbonos y de dobles enlaces. En las figuras 2.3.1.2b y 2.3.1.2c se ofrece una ampliación de la TIC entre los 30 y 50 min del análisis GC/MS y las corrientes de los iones 268, 284, 292, 312, 310 y 294, correspondientes respectivamente a los iones moleculares de los ésteres metílicos de los ácidos C16:1 (el segundo de ellos corresponde al ácido palmitoleico), C17:0 (ramificados y lineal, respectivamente), linolénico, nonadecanoico, nonadecenoico, y C18:2 (el segundo corresponde al ácido linoleico). Esto nos ha permitido asignar los tiempos de retención de compuestos con distinto peso molecular.

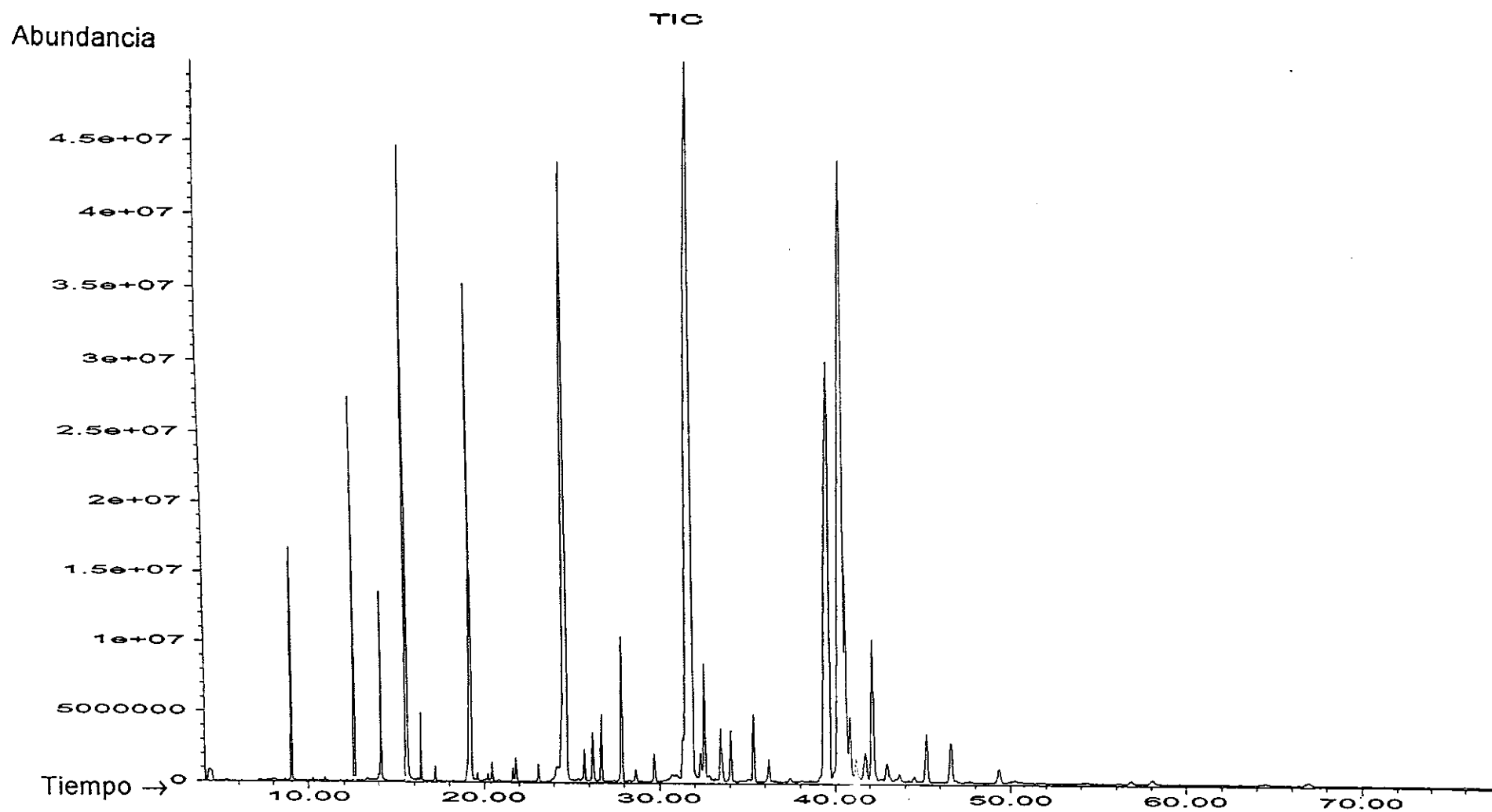


Figura 2.3.1.2a. Corriente de los iones totales de los ácidos grasos por GC/MS

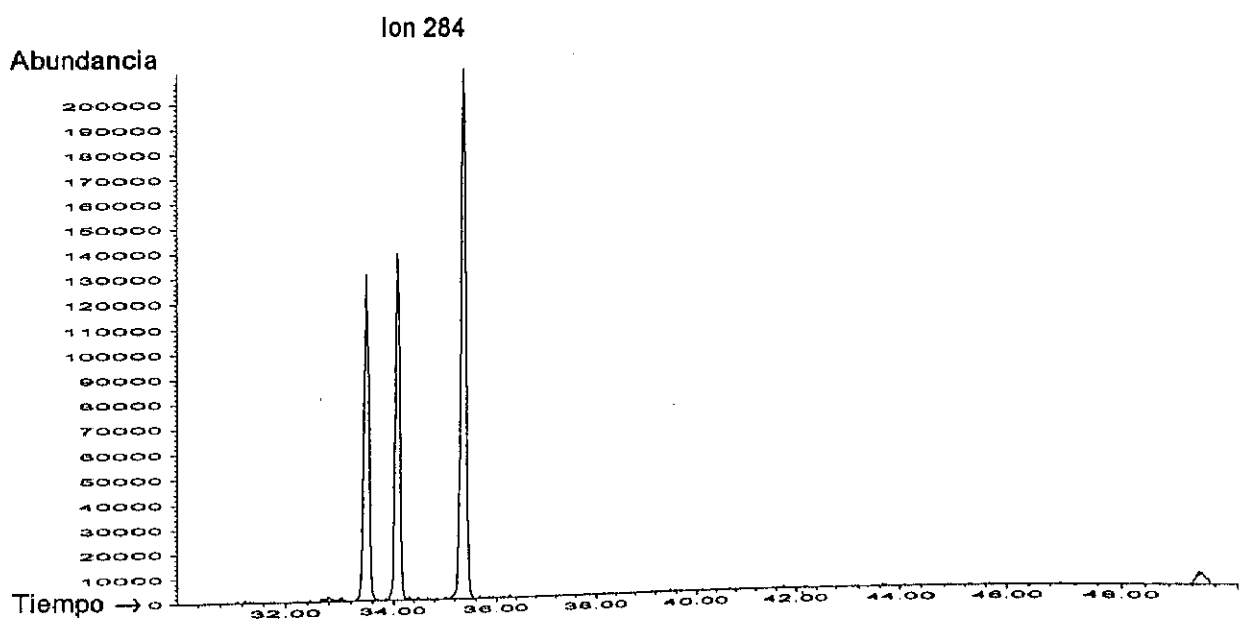
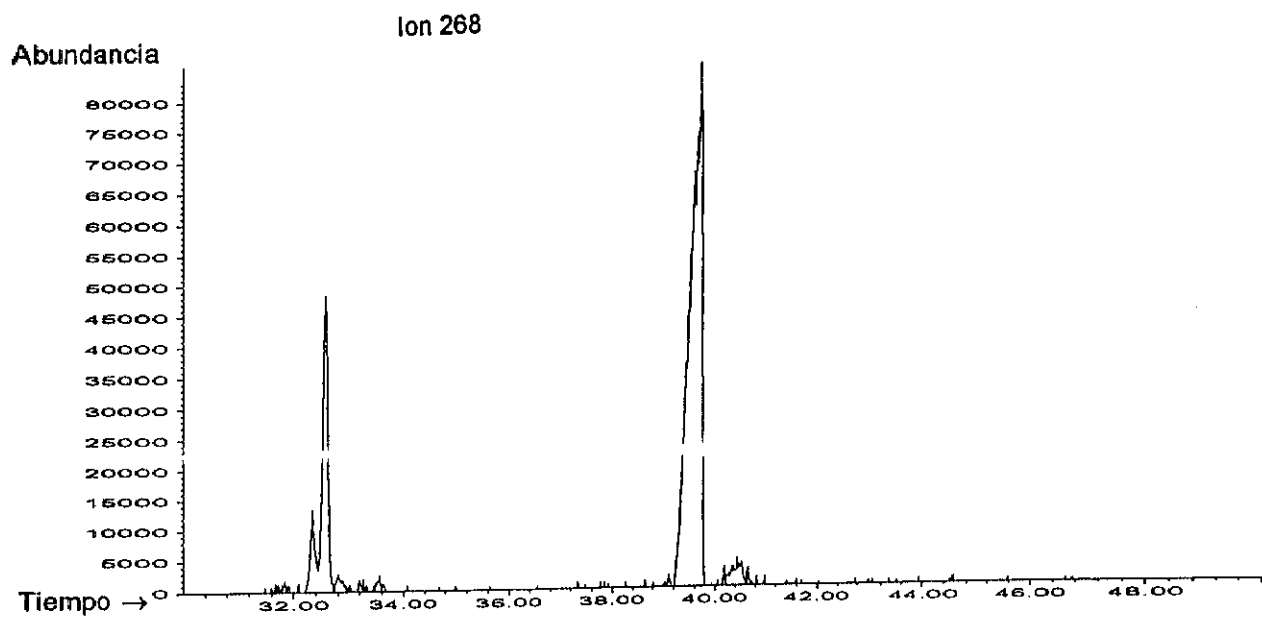
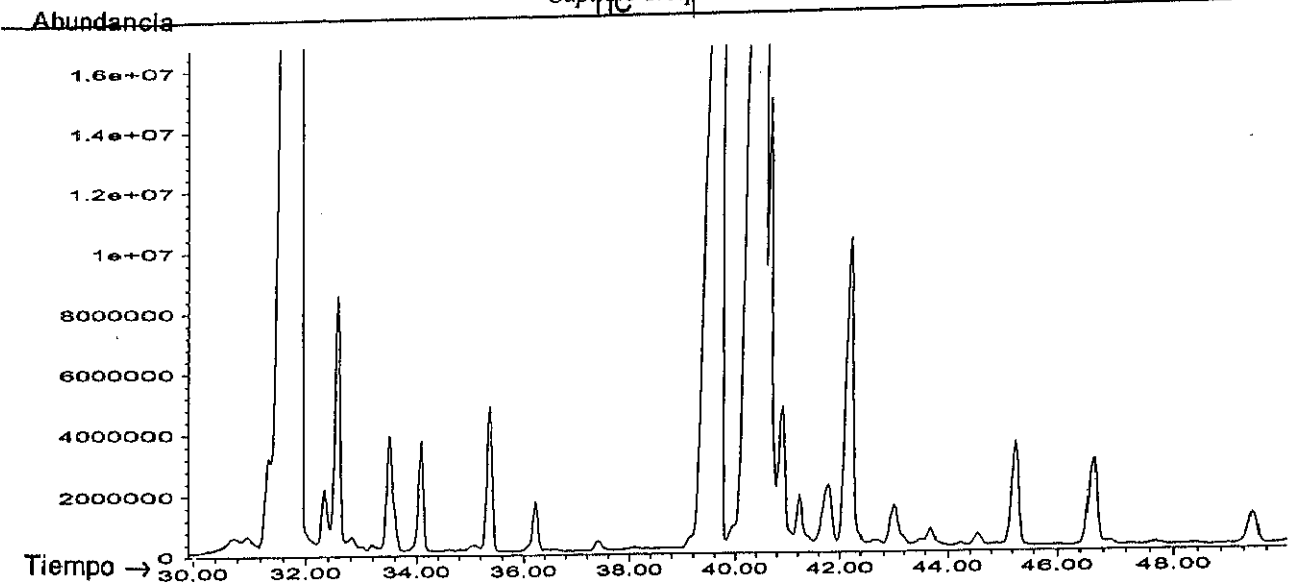


Figura 2.3.1.2b. Corriente de los iones 268 y 284 por GC/MS

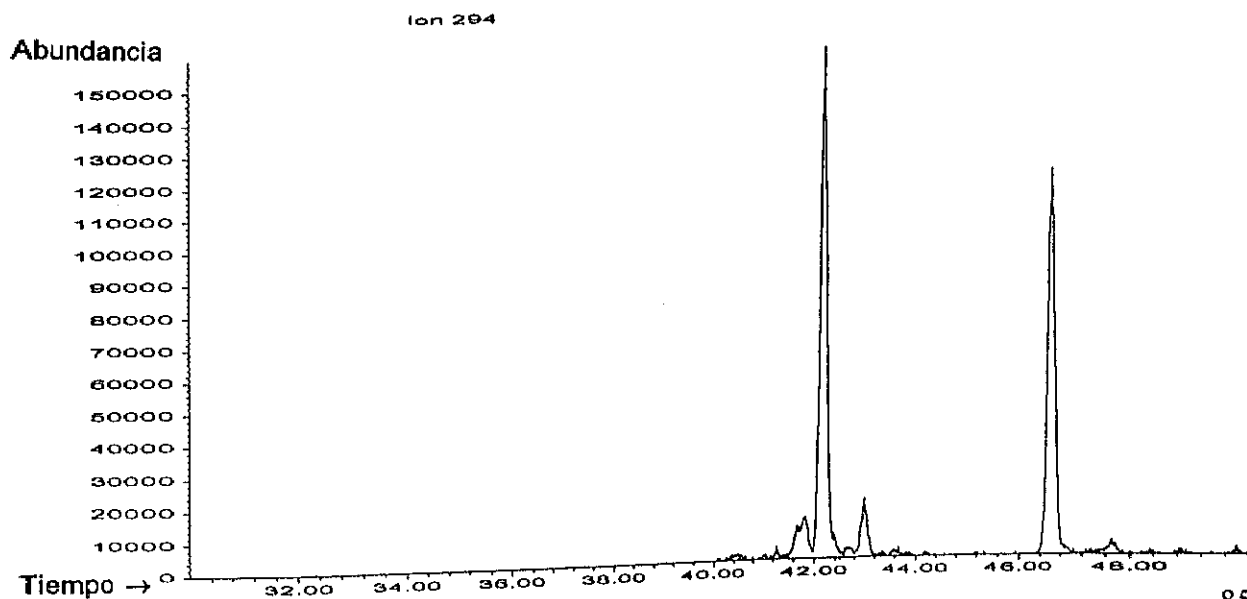
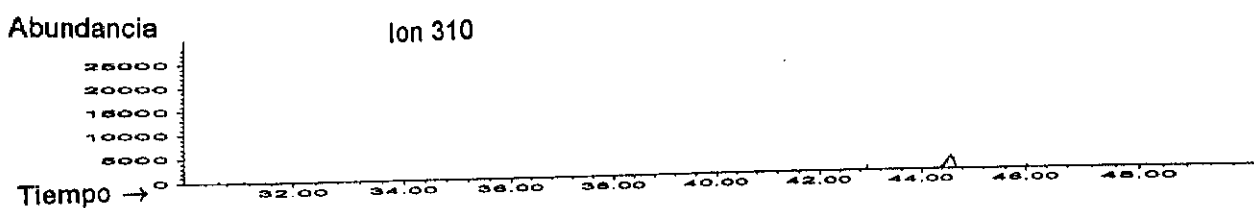
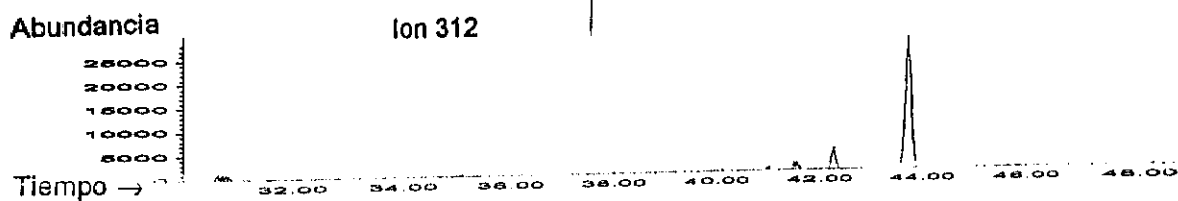
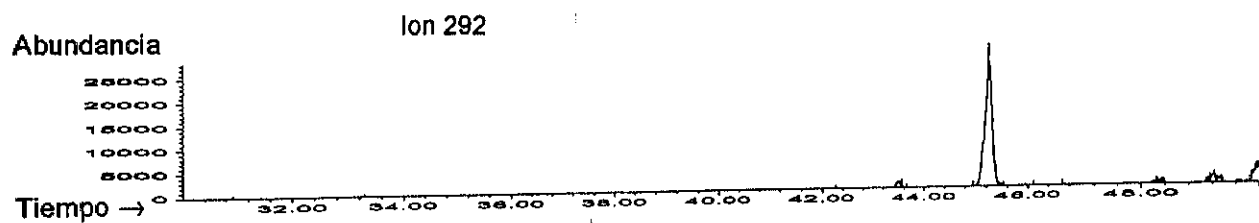
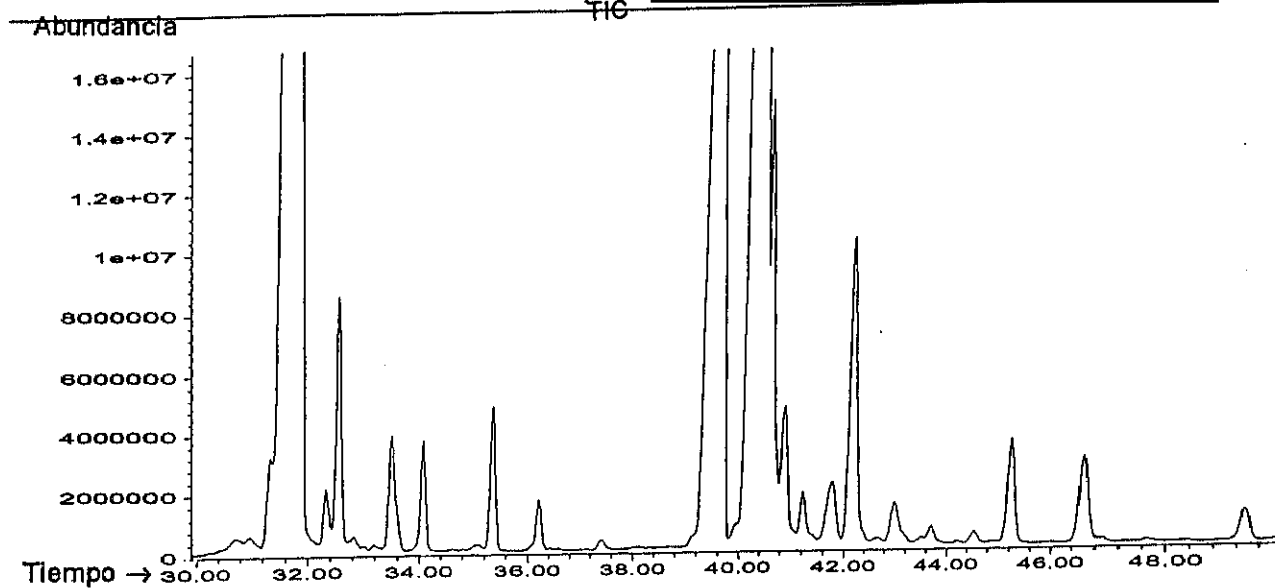


Figura 2.3.1.2c. Corriente de los iones 292, 312, 310 y 294 por GC/MS



### 2.3.1.3- Análisis cuantitativo

En todos los casos se inyectaron los patrones por quintuplicado. Los resultados de los cálculos del factor de respuesta según se indicó en el apartado 2.2.4.5 y sus desviaciones estándar relativas, que hacen referencia a la precisión del método de análisis, fueron los siguientes:

Ácido Graso	$\bar{F}_r$	CV(%)
Butírico	4,20	5,38
Caproico	2,10	3,34
Caprílico	1,61	1,93
Oleico	1,09	4,00
Linoleico	1,15	4,05
Linolénico	1,15	4,28

En la tabla 2.3.1.3 se ofrecen los porcentajes en que se encuentran los ácidos grasos de los triglicéridos mayoritarios estimados en la grasa total de la leche de oveja. Los resultados del análisis de la grasa de oveja demostraron que los ácidos mayoritarios son el palmítico, mirístico y oleico por este orden, pero también es importante la cantidad en la que se encuentran los ácidos de cadena corta y media (4 a 12 carbonos). El ácido vaccénico se encuentra en una concentración mayor a la de otros ácidos insaturados como el miristoleico, palmitoleico y linoléico, siendo el tercer ácido insaturado en importancia por su proporción. También es de destacar la alta concentración en que se encuentran los ácidos grasos de cadena impar (sobre todo lineal, pero también ramificada) en comparación con otros tradicionalmente considerados en la estimación de la composición de la grasa láctea, como es el ácido linolénico.

**Tabla 2.3.1.3.** Porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios.

Ác. Graso	%	Ác. Graso	%
Bu	7,36	Pa	1,03
Co	6,50	aiMa	0,18
Cl	4,07	iMa	0,31
Ca	8,55	Ma	0,34
La	7,82	S	6,75
M	16,05	O	10,52
Mi	1,08	V	1,36
aiPd	0,23	L	1,82
Pd	1,29	Ln	0,14
P	24,62		

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ramos y Juárez (1986b). Posteriormente se procedió a la inyección de las 227 fracciones recogidas a la salida de la columna de HPLC para la cuantificación de los ácidos grasos. Los datos que se obtuvieron se procesaron el programa de estimación según el apartado 2.3.3 para obtener las posibles moléculas de triglicéridos presentes en cada fracción.

### *2.3.2- Análisis cualitativo de los triglicéridos de la grasa de leche de oveja*

#### 2.3.2.1- Aplicación de modelos matemáticos

El tiempo muerto del análisis HPLC se calculó a partir del volumen muerto estimado a partir de la ecuación (20), ya que las sustancias que apenas sufren retención en las columnas no son detectables debido a su volatilización a las temperaturas de análisis del evaporador:

$$V_0 = \frac{m_{Metanol} - m_{Agua}}{\rho_{Metanol} - \rho_{Agua}}; \quad \Phi = \frac{V_0}{t_0}; \quad (2.20)$$

Siendo:

$V_0$  el volumen muerto,  $m$  la masa de la columna con metanol o  
 $t_0$  el tiempo muerto, agua,  
 $\Phi$  el flujo,  $\rho$  la densidad.

El volumen muerto fue de 2,54 mL, que con el flujo de 0,9 mL/min del método de HPLC dieron un tiempo muerto de 2,82 min.

Los resultados obtenidos para la ecuación (2.12) tomando datos de todos los patrones de triglicéridos proporcionaron valores bajos del coeficiente de determinación ( $r^2$ ):

$$\log k' = -0,34074 + 0,04176NC - 0,0699ND, \quad r^2 = 0,9390; \quad (2.21)$$

y una no adecuada distribución de los residuos (figura 2.3.2.1a), por lo que no se pudo asumir que la regresión fuese lineal.

La aplicación del modelo de Takahashi y col. (1988) ofreció los siguientes resultados:

$$\log k'_{AAB} = 0,15451 + 0,6287 \log k'_{AAA} + 0,2770 \log k'_{BBB}, \quad r^2 = 0,9961; \quad (2.22)$$

$$\log k'_{ABC} = 0,17554 + 0,6002 \log k'_{AAA} + 0,0342 \log k'_{BBB} + 0,2629 \log k'_{CCC}, \\ r^2 = 0,9992. \quad (2.23)$$

En la primera de las regresiones (2.22) los resultados de los coeficientes son semejantes a los esperados (2/3 para el primero y 1/3 para el segundo) y el coeficiente de determinación es próximo a la unidad. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los

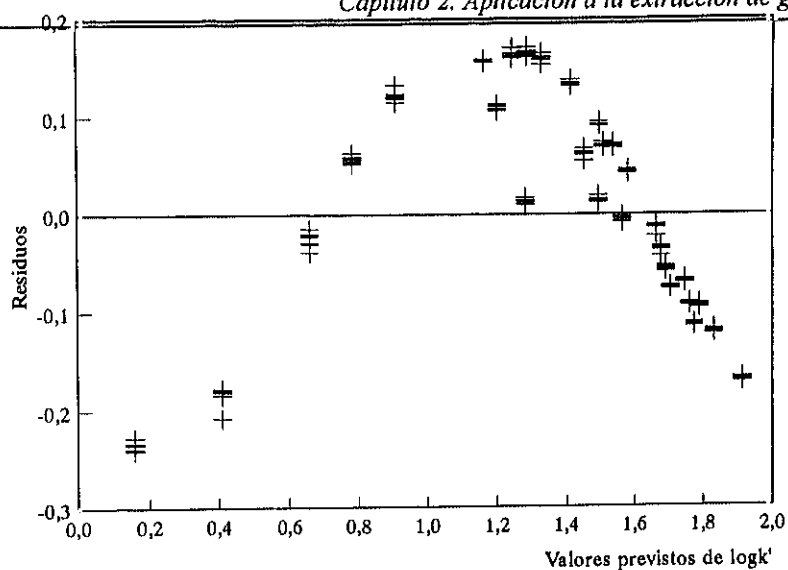


Figura 2.3.2.1a. Distribución de residuos obtenida al utilizar todos los patrones de triglicéridos

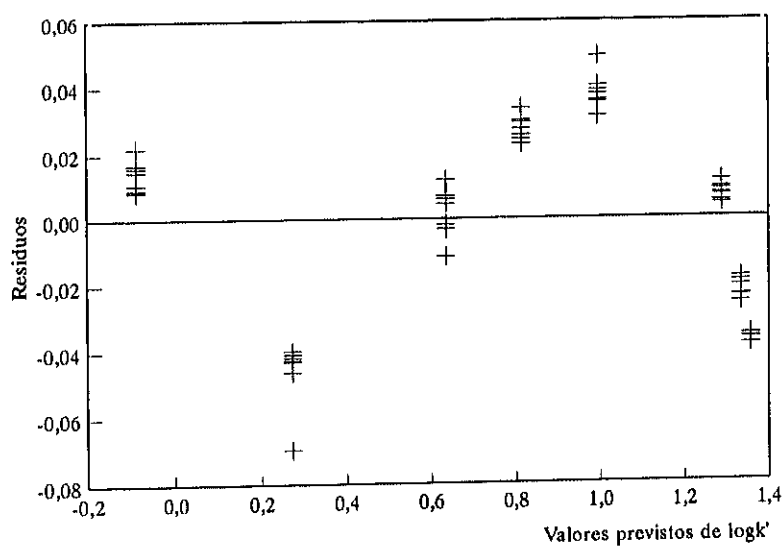


Figura 2.3.2.1d. Distribución de residuos tras el análisis de los patrones que eluyen durante el primer gradiente e isocrático

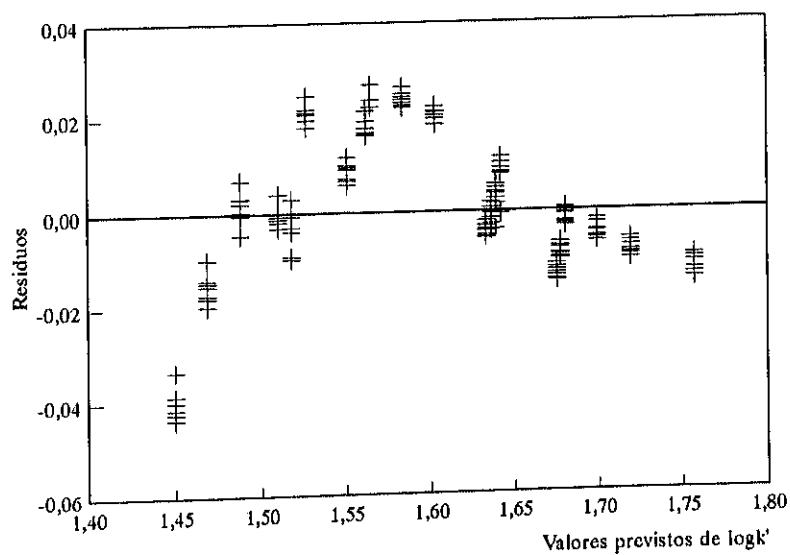


Figura 2.3.2.1e. Distribución de los residuos tras el análisis de los patrones que eluyen durante el segundo gradiente e isocrático

patrones de triglicéridos homogéneos que pudieron utilizarse fueron tan sólo 6 para 12 triglicéridos heterogéneos y que no pudieron conseguirse datos para tiempos anteriores al minuto 75 ( $t_r$  del LaLaM). Los resultados tras la aplicación de los datos a la segunda ecuación (2.23) no fueron los deseados, los coeficientes deberían ser todos semejantes a 1/3; el hecho de tener un coeficiente de determinación tan elevado es sólo una consecuencia de haber utilizado un único patrón heterogéneo (OPS).

La figura 2.3.1.2b muestra un cromatograma de aceite de soja. Al ampliar los datos disponibles con la utilización del aceite de soja, los resultados fueron:

$$\log k'_{AAB} = 0,12801 + 0,6257 \log k'_{AAA} + 0,2962 \log k'_{BBB}, \quad r^2 = 0,9971; \quad (2.24)$$

$$\log k'_{ABC} = 0,01969 + 0,1393 \log k'_{AAA} + 0,3931 \log k'_{BBB} + 0,4433 \log k'_{CCC}, \\ r^2 = 0,9961. \quad (2.25)$$

Estos resultados no mejoraron los anteriores. De este modo se demostró que el modelo de Takahashi y col. no se adecuaba al método cromatográfico utilizado en este estudio y se vio imposibilitado su uso para la estimación de los triglicéridos de la grasa láctea.

La figura 2.3.2.1c muestra un cromatograma de FAMES por HPLC con sus tiempos de retención y con los registros para los dos detectores utilizados. Se puede observar que el orden de elución es idéntico al de los triglicéridos a pesar de que la retención sea menor. En primer lugar se obtuvo una ecuación lineal que relacionó la retención cromatográfica de los FAMES con sus constantes moleculares, dando buenos resultados:

$$\log k' = -0,47750 + 0,07356NC - 0,1558ND, \quad r^2 = 0,9934. \quad (2.26)$$

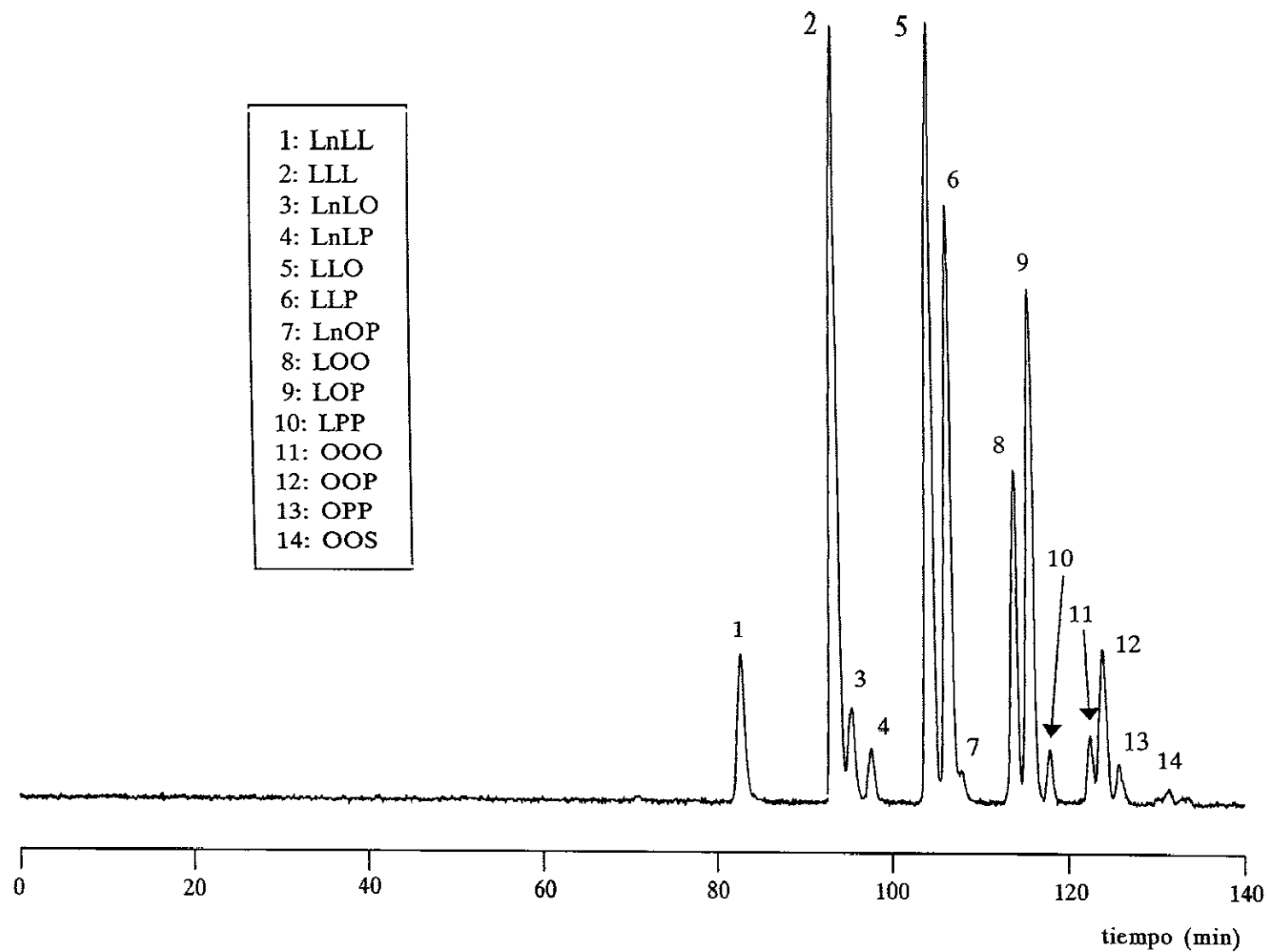


Figura 2.3.2.1b. Cromatograma de aceite de soja

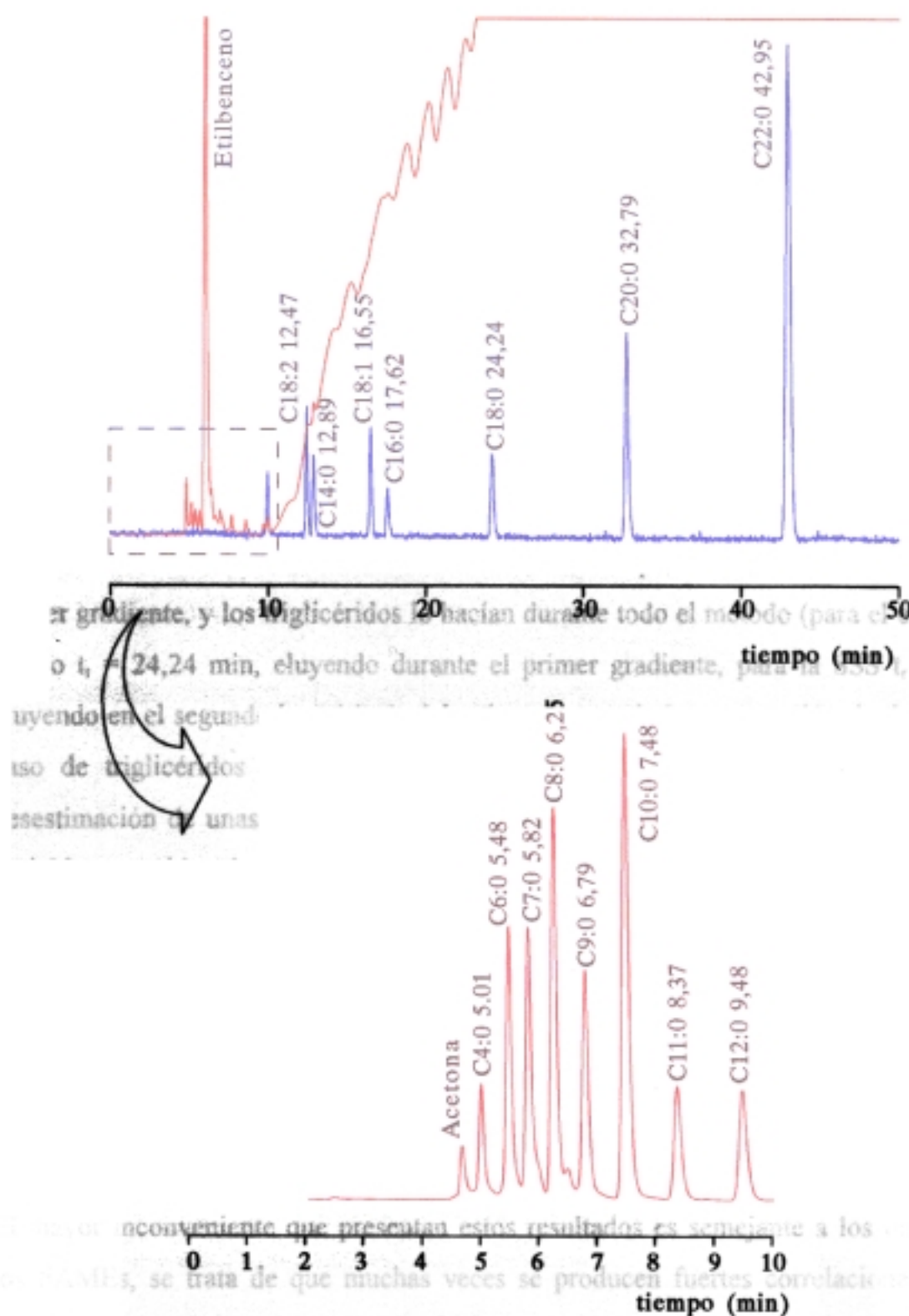


Figura 2.3.2.1c. Cromatograma de patrones de ésteres metílicos de ácidos grasos. Rojo: UV. Azul: detector de masa.

Posteriormente se realizaron regresiones entre los factores de capacidad de los FAMES y los triglicéridos según la siguiente ecuación:

$$\log k'_{TG} = a \log k'_{FAME1} + b \log k'_{FAME2} + c \log k'_{FAME3}; \quad (2.27),$$

procediendo del siguiente modo:

$$\log k'_{FAME} = -0,468 + 0,0732NC_{FAME} - 0,158ND_{FAME}; \quad (2.28)$$

$$\log k'_{TG} = 1,1613 \log k'_{FAME1} + 1,1148 \log k'_{FAME2} + 0 \log k'_{FAME3}; \quad (2.29)$$

pero los resultados no fueron satisfactorios debido a que los FAMES eluían durante el primer gradiente, y los triglicéridos lo hacían durante todo el método (para el estearato de metilo  $t_r = 24,24$  min, eluyendo durante el primer gradiente, para la SSS  $t_r = 160,90$ , eluyendo en el segundo isocrático). Además, ya que existía una repetición de datos para el caso de triglicéridos homogéneos y heterogéneos (del tipo AAB) se producía una desestimación de unas variables por otras debido a las fuertes correlaciones entre estas variables, consideradas como independientes.

La aplicación del método de Goiffon y col. (1981) dio como resultado el siguiente:

$$\log k' = 0,71627 + 0,0191l_A - 0,0428d_A + 0,0224l_B - 0,0511d_B + 0,0164l_C - 0,0272d_C, \\ r^2 = 0,9722. \quad (2.30)$$

El mayor inconveniente que presentan estos resultados es semejante a los obtenidos de los FAMES, se trata de que muchas veces se producen fuertes correlaciones entre las variables coincidentes dependiendo de las constantes moleculares de los triglicéridos utilizados en la regresión.



Por el contrario, si los valores del  $\log k'$  de los patrones utilizados se relacionan con el NC y ND por separado en dos grupos, se obtienen valores altos del coeficiente de determinación y el análisis de los residuos (figuras 2.3.2.1d y e) permite asegurar que la regresión es lineal, del tipo de la representada en la ecuación (2.12). El primero de estos grupos corresponde a los triglicéridos que eluyen durante el primer gradiente y primer isocrático (antes del minuto 70), y que son tributirina, tricaproína, tricaprilina, tripelargonina, tricaprina, trilinolenina, trimiristoleína y trilaurina. El segundo grupo de triglicéridos corresponden al resto de los patrones utilizados. La figura 2.3.2.1f representa un cromatograma de HPLC de los triglicéridos utilizados como patrones, con sus correspondientes tiempos de retención y el método de gradiente utilizado.

Los cálculos realizados para el NEC de triglicéridos que eluían antes de los 70 min fueron los siguientes:

$$\log k' = -0,81130 + 0,06025NC - 0,1280ND; \quad (2.31)$$

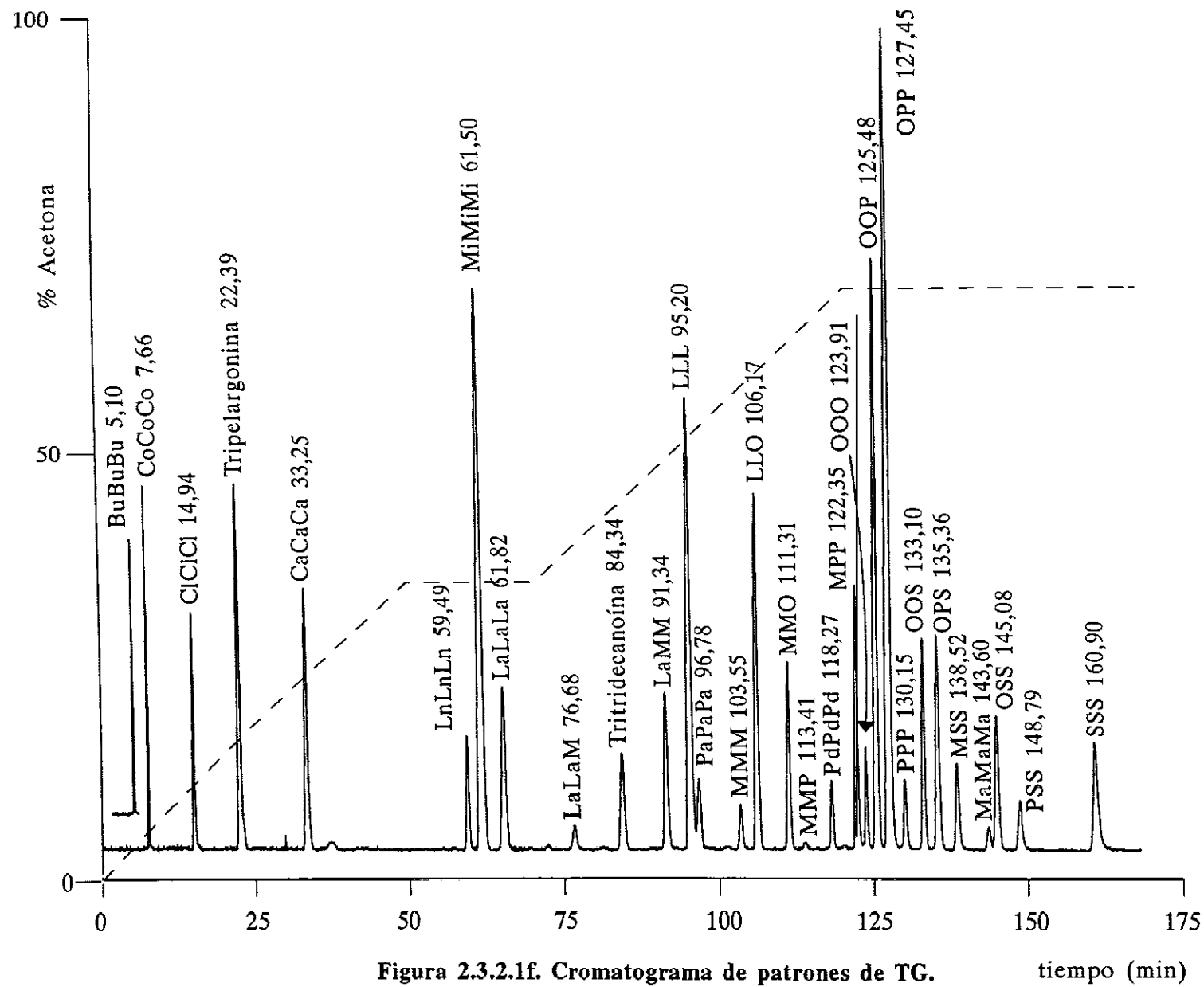
$$\alpha' = \frac{-0,1280}{0,06025} = -2,12; \quad (2.32)$$

$$NEC = NC - 2,12ND; \quad (2.33)$$

$$\log k' = -0,81143 + 0,06025NEC \pm 0,0289; r^2 = 0,9967 \quad (2.34)$$

$$NEC_{min} = \frac{\log k'_1 + 0,81143 - 0,0289}{0,06025}; \quad (2.35)$$

$$NEC_{max} = \frac{\log k'_2 + 0,81143 + 0,0289}{0,06025}; \quad (2.36)$$



siendo:  $k'_1$  el factor de capacidad en el tiempo en que comienza a tomarse una fracción ( $t_1$ ),

$k'_2$  el factor de capacidad en el tiempo en que se termina de tomar una fracción ( $t_2 = t_1 + 40$  s).

Los resultados para el segundo grupo de triglicéridos fueron:

$$\log k' = 0,72097 + 0,01919NC - 0,04121ND; \quad (2.37)$$

$$a' = \frac{-0,04121}{0,01919} = -2,15; \quad (2.38)$$

$$NEC = NC - 2,15ND; \quad (2.39)$$

$$\log k' = 0,72093 + 0,01919NEC \pm 0,0151; \quad r^2 = 0,9699 \quad (2.40)$$

$$NEC_{min} = \frac{\log k'_1 + 0,72093 - 0,0151}{0,01919}; \quad (2.41)$$

$$NEC_{max} = \frac{\log k'_2 + 0,72093 + 0,0151}{0,01919}; \quad (2.42)$$

Estos últimos resultados fueron los únicos válidos de entre los propuestos por otros autores en la bibliografía. La inadecuación de los modelos invalidados se debe a que se propusieron para sistemas isocráticos de separación, condiciones en las que se podría haber obtenido buenos resultados en lo que se refiere a la adecuación de los modelos; sin embargo (tal como ocurre en los estudios llevados a cabo por otros investigadores en sistemas isocráticos de elución), los resultados en la separación cromatográfica de los triglicéridos no son tan buenos como los conseguidos en el sistema de gradientes utilizado en el presente estudio, con la consecuente estimación de un número bajo de

especies moleculares. Al realizar la modelización tras dividir el cromatograma en dos tramos se consiguió que estos modelos fueran válidos y perfectamente aplicables, y sumado al sistema cromatográfico que permitió la obtención de un gran número de picos, se logró la estimación de un gran número de especies moleculares de triglicéridos con gran garantía. La aplicación de los análisis por GC de las fracciones de HPLC mejoró los resultados al obtenerse la composición en ácidos grasos de cada fracción y, de este modo, realizar la estimación también en función de las cantidades en que se encuentran cada uno de los triglicéridos en cada fracción, no sólo en función de su presencia.

#### 2.3.2.2- Estimación de la composición en triglicéridos de grasa láctea ovina.

La aplicación de las ecuaciones anteriores (2.35, 2.36, 2.41 y 2.42) redujo el número de triglicéridos posibles en cada una de las 227 fracciones recogidas a la salida de la columna de HPLC a aquellos con adecuados parámetros moleculares (NEC) para cada pico en su tiempo de retención correspondiente.

Además, el análisis por GC de los ácidos grasos presentes en cada fracción también redujo drásticamente el número de especies moleculares estimadas para cada pico, y en algunos casos limitó la posibilidad incluso a un único triglicérido. La composición en triglicéridos de cada fracción se calculó a partir del porcentaje molar de los principales ácidos grasos en cada fracción, teniendo en cuenta que las especies más probables que se consideraron fueron aquellas que se encontraron en porcentajes altos (normalmente mayores a 0,01%, dependiendo del número de ácidos grasos encontrados en cada fracción) y que sus NEC se incluyeron entre los límites de NEC de cada fracción teniendo en cuenta el error estándar de las regresiones como los valores de  $NEC_{mín}$  y  $NEC_{máx}$  (ecuaciones 2.35, 2.36, 2.41 y 2.42).

En los anexos I y II se muestran los programas desarrollados en QuickBasic para la estimación de la composición en triglicéridos que eluyen antes y después de los 70 min

respectivamente. Estos programas realizan una selección de los triglicéridos adecuados para la estimación de entre todos los posibles. Para ello aplica las ecuaciones 2.33 y 2.39 para el cálculo del NEC de cada triglicérido, posteriormente calcula el  $NEC_{mín}$  y  $NEC_{máx}$  de cada fracción y selecciona los triglicéridos de NEC comprendido en el intervalo. Tras esta primera selección, el programa calcula los porcentajes molares en que se encuentra cada triglicérido a partir de los datos del análisis de GC y reduce el número de triglicéridos a los que se encuentran en  $\%mol > 0,01$ .

A continuación se detallan, paso a paso, los procesos seguidos para la estimación de la composición en triglicéridos de la grasa láctea en tres tramos del cromatograma de HPLC, mostrando cada uno de ellos una dificultad creciente. La figura 2.3.2.2a muestra el cromatograma de los triglicéridos indicando las zonas que se describen como ejemplos de demostración:

A) en primer lugar, cuando fue posible, se utilizaron los tiempos de retención de triglicéridos puros para la identificación. Este es el caso más sencillo, y pudo realizarse para la estimación de la trioleína (OOO). El tiempo de retención de la trioleína usada como patrón (123,9 min) pudo hacerse corresponder con el tiempo de retención de un pico que aparecía durante los minutos 122 y 123, óptimamente resuelto respecto de los anterior y posterior. No obstante, tras realizarse los análisis de las fracciones por GC y el cálculo del NEC adecuado al tiempo de retención, la asignación quedó confirmada. El análisis de ácidos grasos correspondió al de las fracciones 164 - 165. La tabla 2.3.2.2a reúne los resultados obtenidos en cada paso para la asignación de la trioleína: primeramente se exponen los resultados obtenidos en el análisis por GC en cada fracción, seguidamente se calcula el número de triglicéridos posibles (si se considera que los ácidos grasos se distribuyen al azar e independientemente de que tengan NEC adecuado o no al tiempo correspondiente), por último se ofrecen los triglicéridos resultantes tras las limitaciones que los reducen únicamente a aquellos con NEC apropiado y en porcentajes molares superiores a 0,01% (resultados ofrecidos por el programa del anexo II).

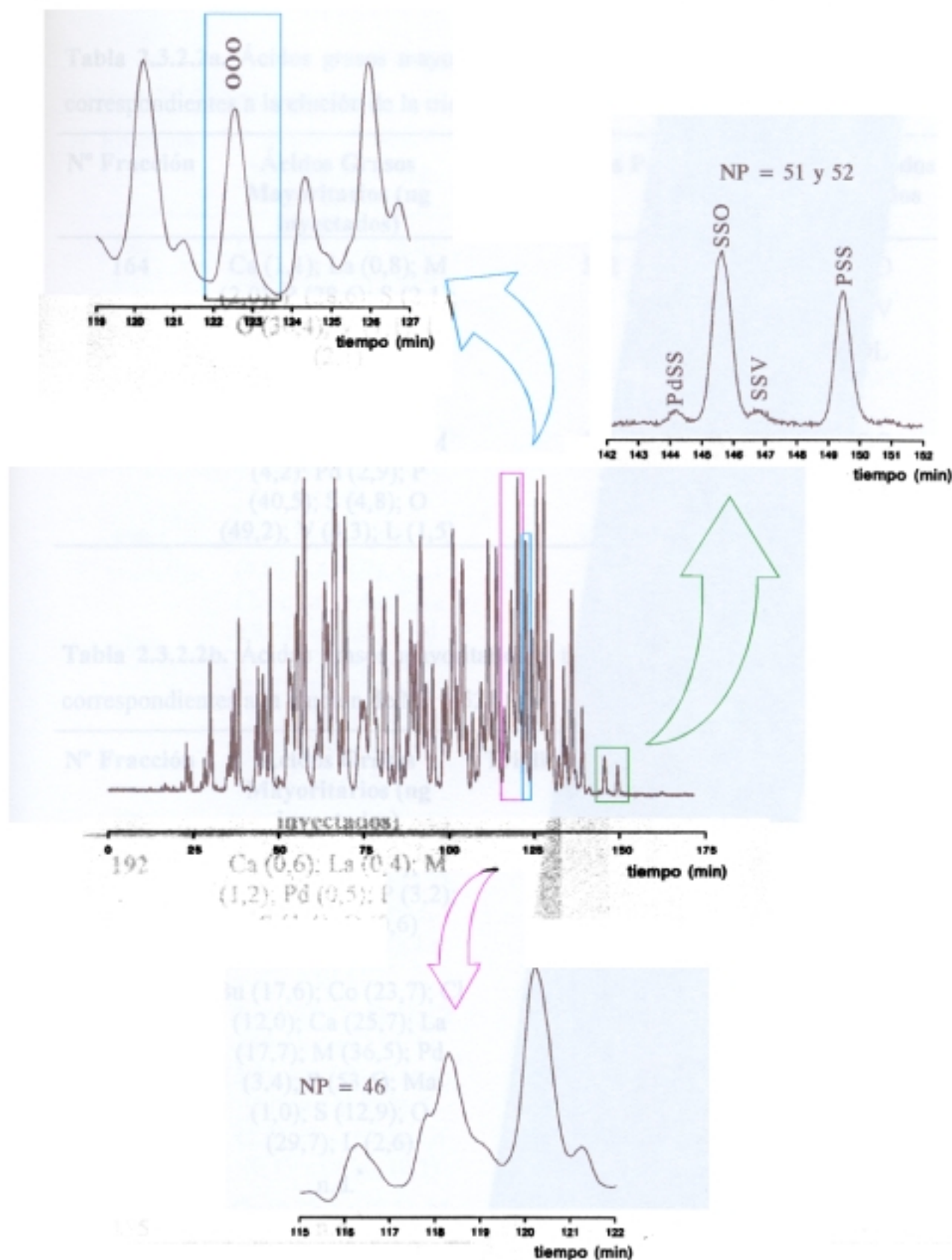


Figura 2.3.2.2a. Cromatograma de los triglicéridos de grasa láctea ovina y tres fragmentos de OOO, NP = 46, y NP = 51, 52.

**Tabla 2.3.2.2a.** Ácidos grasos mayoritarios y triglicéridos estimados en las fracciones correspondientes a la elución de la trioleína.

Nº Fracción	Ácidos Grasos Mayoritarios (ng inyectados)	Triglicéridos Posibles	Triglicéridos Estimados
164	Ca (1,1); La (0,8); M (2,0); P (28,6); S (2,1); O (36,4); V (1,1); L (2,1)	512	OOO OOV SOL
165	Ca (1,3); La (1,2); M (4,2); Pd (2,9); P (40,5); S (4,8); O (49,2); V (4,3); L (1,5)	729	OOO OOV SOL

**Tabla 2.3.2.2b.** Ácidos grasos mayoritarios y triglicéridos estimados en las fracciones correspondientes a la elución de NP = 52.

Nº Fracción	Ácidos Grasos Mayoritarios (ng inyectados)	Triglicéridos Posibles	Triglicéridos Estimados
192	Ca (0,6); La (0,4); M (1,2); Pd (0,5); P (3,2); S (1,4); O (0,6)	343	PdSS SSO PSS
193	Bu (17,6); Co (23,7); Cl (12,0); Ca (25,7); La (17,7); M (36,5); Pd (3,4); P (53,5); Ma (1,0); S (12,9); O (29,7); L (2,6)	1728	PSS
194	n.d.*	0	-
195	n.d.*	0	-

Tabla 2.3.2.2b (continuación).

Nº Fracción	Ácidos Grasos Mayoritarios (ng inyectados)	Triglicéridos Posibles	Triglicéridos Estimados
196	C <sub>10:1</sub> (8,8); La (0,6); C <sub>13:0</sub> (2,9); C <sub>13:1</sub> (1,3); M (1,4); P (2,6); S (0,6); O (0,9)	512	SSO PSS
197	Bu (1,1); Co (1,6); Cl (2,0); Ca (5,8); La (3,3); M (8,0); Pd (0,7); P (16,1); S (7,0); O (1,0)	1000	PdSS SSO PSS
198	Bu (3,1); Co (4,0); Cl (4,0); Ca (8,9); C <sub>10:1</sub> (2,1); La (5,4); C <sub>13:0</sub> (8,4); M (10,5); Pd (1,1); P (16,6); S (5,0); O (13,0); V (1,0); L (2,1); C <sub>19:0</sub> (0,7); Ln (0,9); <i>clt</i> C <sub>18:2</sub> (0,5); C <sub>20:0</sub> (0,2)	5832	-
199	Bu (1,0); Co (2,3); Cl (12,3); Ca (2,0); La (2,0); M (3,4); P (5,7); S (2,0); O (3,4); L (0,7); C <sub>19:0</sub> (0,2); Ln (0,1)	1728	-
200	Bu (1,0); Co (3,5); Cl (10,1); Ca (2,9); La (5,3); M (7,8); S (4,6); O (3,9); V (0,2); L (1,0); C <sub>19:0</sub> (0,2); Ln (0,1); <i>clt</i> C <sub>18:2</sub> (0,1)	2197	SSO PSS
201	Ca (0,3); La (0,3); M (0,8); P (3,3); S (2,7); O (0,9)	216	SSO PSS
202	M (1,1); P (4,0); S (2,3); O (1,2)	64	SSO PSS



Tabla 2.3.2.2b (continuación).

Nº Fracción	Ácidos Grasos Mayoritarios (ng inyectados)	Triglicéridos Posibles	Triglicéridos Estimados
203	Co (0,4); Cl (0,2); Ca (1,0); La (0,4); M (0,9); P (2,6); S (1,7); O (0,8)	512	SSO PSS

\* no detectados.

Tabla 2.3.2.2c. Ácidos grasos mayoritarios y triglicéridos estimados en las fracciones correspondientes a la elución de NP = 46.

Nº Fracción	Ácidos Grasos Mayoritarios (ng inyectados)	Triglicéridos Posibles	Triglicéridos Estimados
151	Co (0,8); Ca (1,4); La (2,0); M (5,3); <i>i</i> Pd (1,0); <i>ai</i> Pd (1,2); Pd (1,8); P (5,1); Pa (1,6); <i>i</i> Ma (0,6); <i>ai</i> Ma (0,6); Ma (0,5); S (1,4); O (8,3); V (0,2); L (1,7); <i>ctc</i> C <sub>18:2</sub> (0,5)	4913	73
152	Ca (1,2); La (1,0); M (3,6); <i>i</i> Pd (0,3); <i>ai</i> Pd (0,3); Pd (1,0); P (9,4); Pa (1,6); S (1,2); O (10,8); L (3,7); <i>ctc</i> C <sub>18:2</sub> (1,4)	1728	53
153	Co (0,6); Cl (1,2); Ca (1,3); La (1,8); M (21,1); Pd (1,5); P (15,1); Pa (2,6); S (1,0); O (22,4); V (0,5); L (4,6); <i>ctc</i> C <sub>18:2</sub> (1,3)	2197	43

Tabla 2.3.2.2c (continuación).

Nº Fracción	Ácidos Grasos Mayoritarios (ng inyectados)	Triglicéridos Posibles	Triglicéridos Estimados
154	Ca (1,8); La (2,1); C <sub>13:0</sub> (0,5); <i>i</i> M (1,2); M (26,9); <i>i</i> Pd (0,4); <i>ai</i> Pd (0,5); Pd (3,7); P (22,5); Pa (6,2); Ma (1,4); S (3,9); O (36,3); V (2,7); L (3,1); Ln (1,3); <i>ctc</i> C <sub>18:2</sub> (0,9)	4913	75
155	Cl (6,8); Ca (1,2); C <sub>10:1</sub> (1,7); La (1,2); M (6,3); Pd (1,2); P (4,1); S (0,3); O (2,1)	729	10
156	Co (2,5); Cl (0,8); Ca (1,5); La (11,7); M (58,4); <i>i</i> Pd (0,6); <i>ai</i> Pd (1,3); Pd (0,9); P (62,5); Pa (2,2); <i>i</i> Ma (0,3); <i>ai</i> Ma (0,6); Ma (0,1); S (10,1); O (45,1); V (3,4); L (6,0); Ln (0,4); <i>ctc</i> C <sub>18:2</sub> (2,0)	6859	48
157	Cl (5,4); Ca (1,0); La (6,9); M (29,2); P (18,3); S (1,5); O (8,8)	343	6
158	Ca (0,8); La (3,0); M (11,8); P (10,1); Pa (1,0); S (1,3); O (1,3); V (0,6)	512	18
159	Cl (2,4); Ca (0,7); La (2,0); M (4,9); P (7,8); S (0,4); O (0,7)	343	6

**Tabla 2.3.2.2c (continuación).**

<b>Nº Fracción</b>	<b>Ácidos Grasos Mayoritarios (ng inyectados)</b>	<b>Triglicéridos Posibles</b>	<b>Triglicéridos Estimados</b>
<b>160</b>	Bu (1,8); Co (1,8); Cl (1,1); Ca (7,2); La (14,5); M (46,7); <i>i</i> Pd (3,2); <i>ai</i> Pd (5,4); Pd (4,8); P (75,6); Pa (1,1); <i>i</i> Ma (2,0); <i>ai</i> Ma (1,7); Ma (1,1); S (22,0); O (21,4); V (0,5); L (1,5); Ln (0,2); <i>ctc</i> C <sub>18:2</sub> (0,3); C <sub>20:0</sub> (0,7)	9261	66
<b>161</b>	Ca (6,6); La (5,7); M (19,2); <i>i</i> Pd (1,4); <i>ai</i> Pd (1,5); Pd (1,9); P (32,8); Pa (0,4); <i>i</i> Ma (0,7); <i>ai</i> Ma (0,7); Ma (0,4); S (12,1); O (5,2); V (0,8); Ln (0,9)	3375	70
<b>162</b>	Co (0,7); Cl (0,6); Ca (2,1); La (1,1); M (4,5); <i>i</i> Pd (0,5); <i>ai</i> Pd (0,8); Pd (2,4); P (7,8); <i>i</i> Ma (0,3); <i>ai</i> Ma (0,4); Ma (0,7); S (2,9); O (16,8); V (1,2); L (0,8)	4096	82
<b>163</b>	Ca (0,9); La (1,4); M (8,4); <i>i</i> Pd (1,3); <i>ai</i> Pd (2,6); Pd (6,8); P (17,2); <i>i</i> Ma (1,3); <i>ai</i> Ma (1,6); Ma (1,8); S (3,8); O (47,6); V (2,2); L (1,0)	2744	86

La trioleína es el triglicérido que se presenta en mayor porcentaje molar, siendo el OOV minoritario y eluyendo en la cola del anterior (el enlace *trans* prolonga el tiempo de retención). Posteriormente eluye el SOL porque la acumulación de dobles enlaces en unos ácidos (como el linoleico) y la presencia de ácidos saturados (como el palmítico) provoca un aumento en el tiempo de retención respecto a otros triglicéridos con igual NEC pero con igual ND en cada ácido graso (OOO). La mejora de la eficacia de las columnas de HPLC ( $n^{\circ}$  platos/m = 160.369 en la columna de 15 cm, columna de 25 cm: 161.364) confirmó los resultados anteriores al aparecer tres picos donde antes existía únicamente uno. La figura 2.3.2.2b muestra el segmento de cromatograma correspondiente a estos triglicéridos donde se separaran los tres triglicéridos tras mejorar la eficacia de la separación.

B) en segundo lugar se describe el desarrollo de la estimación llevada a cabo para los triglicéridos de NP = 52. Estos triglicéridos eluyen en el cromatograma de HPLC durante los minutos 143 a 151, tal como se muestra en la figura 2.3.2.2a, y se recogieron en las fracciones 192 a 203. En primer lugar se analizaron los FAMES de cada fracción por GC y se obtuvieron las áreas resultantes tras la integración. La figura 2.3.2.2c corresponde al cromatograma obtenido por GC de los FAMES de la fracción 201, recogida desde los 147 min 20 s hasta el minuto 148. La tabla 2.3.2.2b incluye los resultados de los ácidos grasos mayoritarios para cada fracción, el número de triglicéridos posibles y los triglicéridos finales, resultantes de la selección llevada a cabo en función de que tengan el NEC apropiado y que a la vez posean un %mol >0,01 (aplicación del programa del anexo II).

El análisis de la fracciones 194 y 195 no dio cantidades cuantificables de FAMES; las fracciones 198 y 199 sí las dieron, pero los triglicéridos posibles no estuvieron dentro del intervalo de NEC adecuado para el tiempo de elución. Las primeras fracciones resultaron contener un triglicérido de NP = 51, el PdSS, que apareció como un pequeño pico anterior al SSO. Se estimó que el SSV era un pequeño pico que eluía posteriormente al SSO, ya se ha citado anteriormente que los dobles enlaces *trans* retardan el tiempo de retención respecto a los *cis* (El-Hadmy y Perkins, 1981; Laakso y Kallio, 1993), si bien,

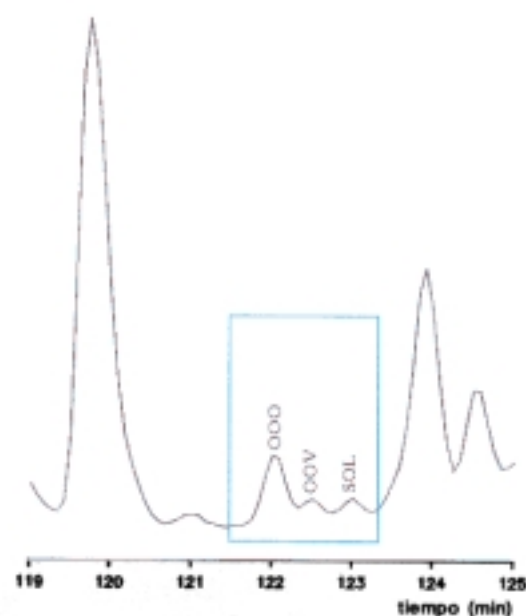


Figura 2.3.2.2b. Cromatograma (fragmento) de grasa láctea ovina correspondiente a los triglicéridos de NP = 48 con tres dobles enlaces tras la mejora de la eficacia de las columnas de HPLC.

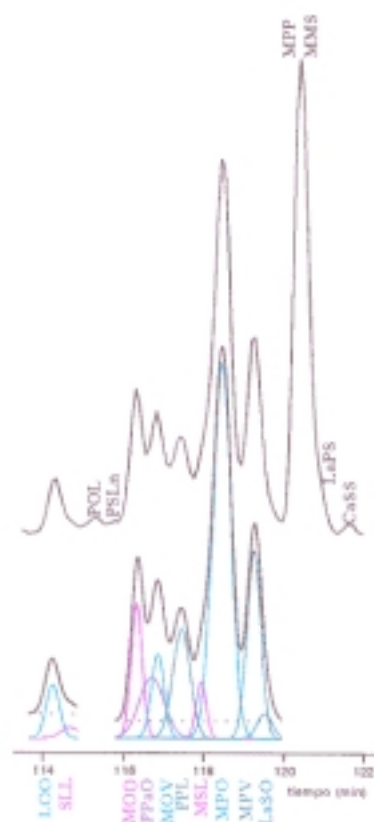


Figura 2.3.2.2g. Desconvoluciones realizadas sobre los triglicéridos de NP = 46 de grasa láctea ovina tras la mejora de la eficacia de las columnas.

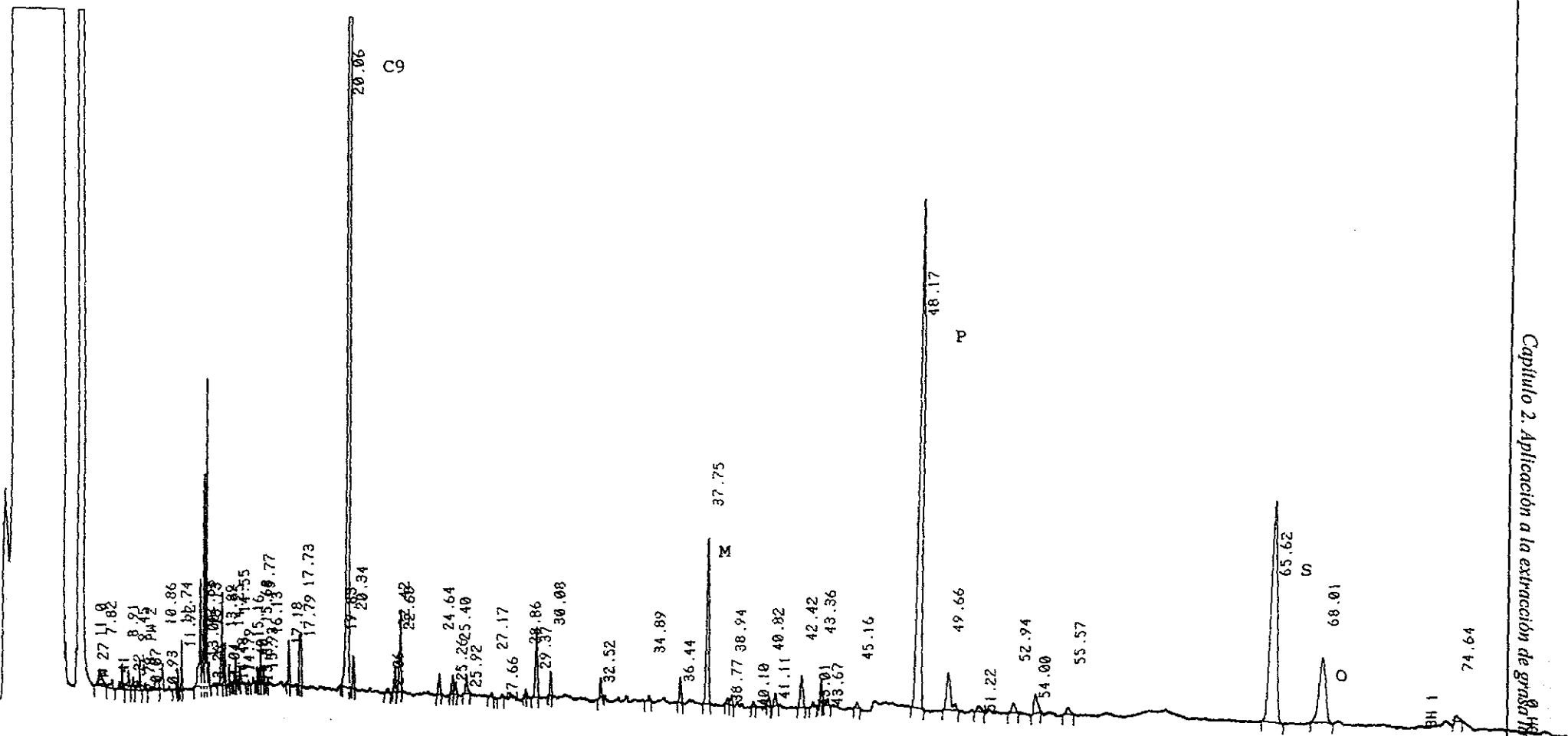
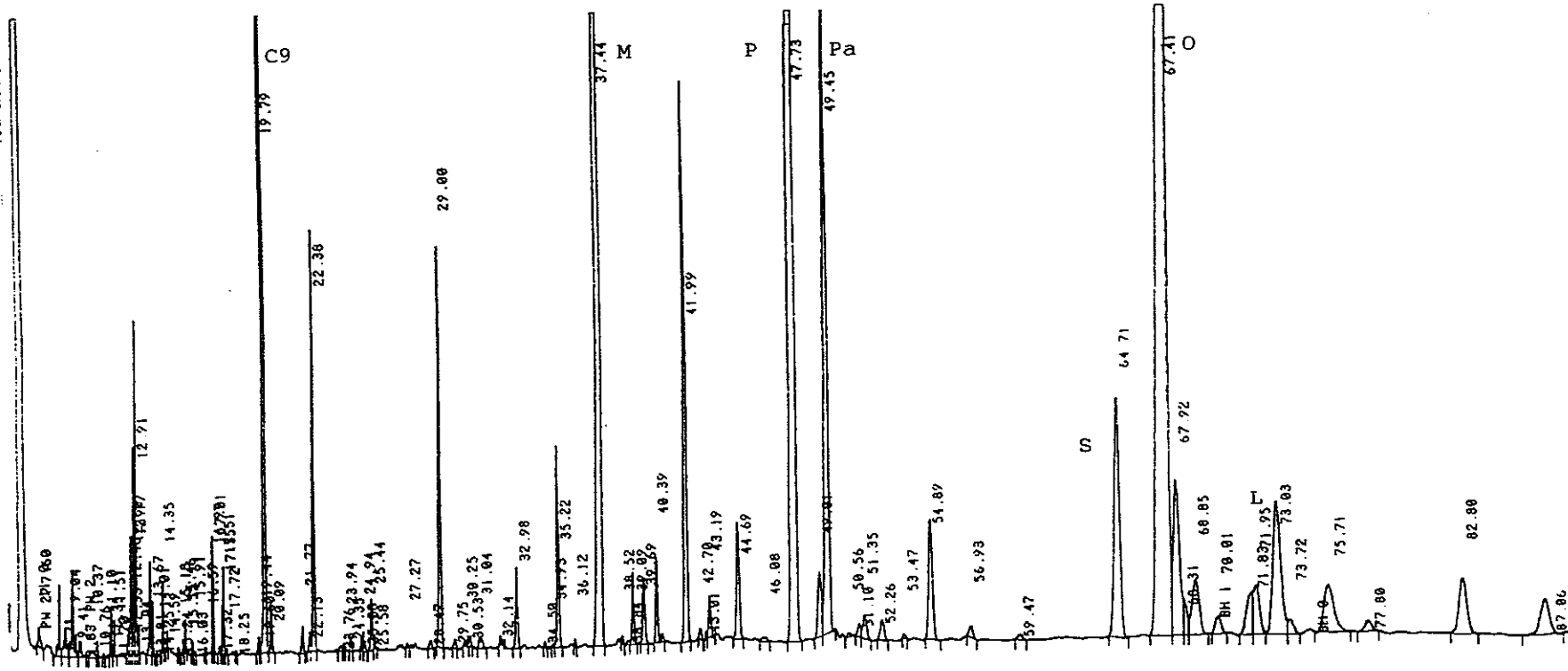


Figura 2.3.2.2c. Cromatograma de los FAMES de la fracción 201 por GC

esto no se pudo contemplar a la hora del cálculo del NEC por no disponer de patrones con este tipo de insaturación. De los picos mayoritarios de  $NP = 52$  en el cromatograma de HPLC, el SSO eluye antes que el PSS por poseer menor NEC. La estimación de los cuatro triglicéridos se adecuó perfectamente a los picos que aparecieron en el cromatograma, tal como se ve en la figura 2.3.2.2a.

C) en último lugar existía el problema de que en la identificación de algunos picos se mostraba de forma clara que ciertas especies podían corresponder a más de una fracción. Teniendo en cuenta el orden de elución junto a una representación de la probabilidad de encontrar un triglicérido específico en una fracción específica fue posible también la asignación de los picos. Es el caso de la asignación de los triglicéridos con  $NP = 46$ , cuyo proceso se detalla a continuación. La figura 2.3.2.2a muestra la sección de cromatograma correspondiente a los triglicéridos con  $NP = 46$ . Este es el más complejo de los casos presentados, ya que las fracciones son de composición muy variada en ácidos grasos, lo que aumenta el número de especies posibles de triglicéridos. El número de especies moleculares de triglicéridos también es mayor porque, con los ácidos grasos descritos, son mayores las combinaciones posibles que posean  $45 < NEC \leq 46$ . Los tiempos de retención de estos triglicéridos se sitúan entre los 116 y 122 min, que corresponde con las fracciones 151 a 163. El cromatograma de la figura 2.3.2.2d se corresponde con la composición en ácidos grasos de la fracción 154, en él aparece un mayor número de ácidos grasos diferentes y en mayor cantidad que en el cromatograma de la fracción 201 (figura 2.3.2.2c). La tabla 2.3.2.2c, tal como las tablas anteriores, muestra los resultados obtenidos en ácidos grasos mayoritarios, triglicéridos totales posibles y triglicéridos finales resultantes de la estimación en cada una de las fracciones. El número de triglicéridos resultantes tras una primera estimación fue muy elevado, por lo que hubo que reducir este número por medio de aumentar el %mol mínimo permitido 0,1%. La tabla 2.3.2.2d reúne los triglicéridos que, finalmente, se consideraron en la estimación.





**Tabla 2.3.2.2d.** Triglicéridos finales con NP = 46 en cada fracción para la estimación y su NEC correspondiente.

Nº Fracción	Triglicérido (NEC)
151	LOO (45,41), POL (45,56), MOO (45,71), PPaO (45,71), MOV (45,71), PPL (45,71), MSL (45,71), MPO (45,85), MPV (45,85), LaSO (45,85), MPP (46), MMS (46), LaPS (46)
152	LOO, SLL (45,41), POL, MOO, PPaO, PPL, MSL, MPO, LaSO, MPP, MMS, LaPS
153	LOO, POL, MOO, PPaO, MOV, PPL, MSL, MPO, MPV, LaSO, MPP, MMS
154	LOO, POL, PSLn (45,56), MOO, PPaO, MOV, PPL, MSL, MPO, MPV, LaSO, MPP, MMS, LaPS
155	MOO, MPO, MPP
156	LOO, POL, MOO, PPaO, MOV, PPL, MSL, MPO, MPV, LaSO, MPP, MMS, LaPS
157	MOO, MPO, LaSO, MPP, MMS, LaPS
158	MOO, PPaO, MOV, MPO, MPV, LaSO, MPP, MMS, LaPS
159	MOO, MPO, MPP, MMS, LaPS
160	POL, MOO, PPaO, MOV, PPL, MPO, MPV, LaSO, MPP, MMS, LaPS
161	PSLn, MOO, MPO, MPV, LaSO, MPP, MMS, LaPS, CaSS (46)
162	LOO, POL, MOO, MOV, PPL, MSL, MPO, MPV, LaSO, MPP, MMS, LaPS, CaSS
163	LOO, POL, MOO, MOV, PPL, MPO, MPV, LaSO, MPP, MMS, LaPS

La figura 2.3.2.2 (e y f) muestran una representación de la probabilidad de encontrar los 16 triglicéridos de NP = 46 resultantes, realizada a partir de los %mol obtenidos para cada una de las especies moleculares en cada fracción. Esta figura muestra que puede existir más de un máximo para cada triglicérido. La asignación se realizó siguiendo un orden creciente de NEC. Sin embargo, existen especies con igual NEC, por lo que la asignación realizó en base a los porcentajes molares y a criterios de elución que no pudieron valerse de un desarrollo matemático. Un segundo análisis realizado en columnas con la eficacia mejorada demostró que el número de triglicéridos estimados se adecuaba al número de picos en este nuevo análisis, además, el orden asignado fue correcto porque

Figura 2.3.2.2e. Probabilidad de encontrar los triglicéridos con NP = 46.

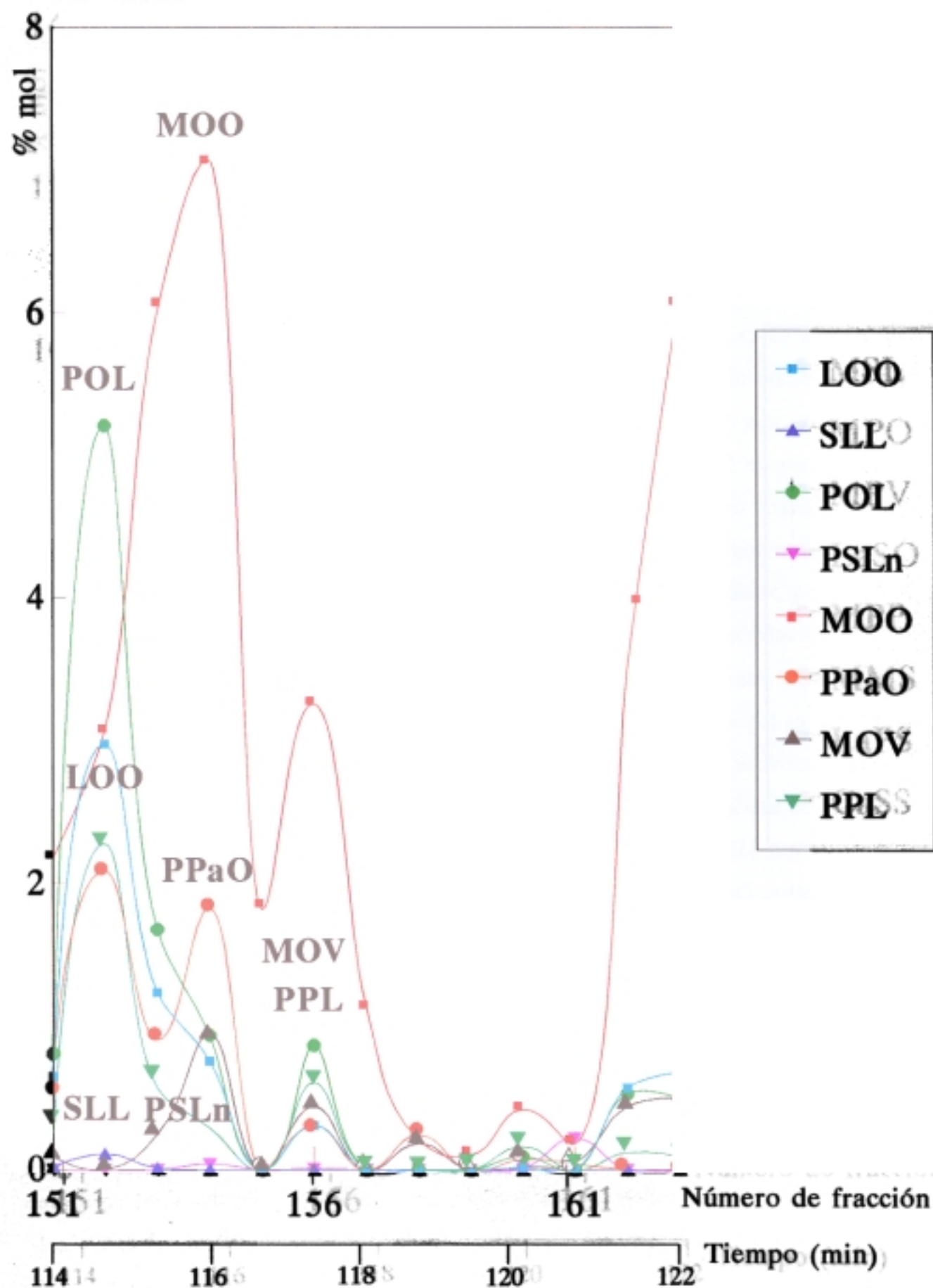
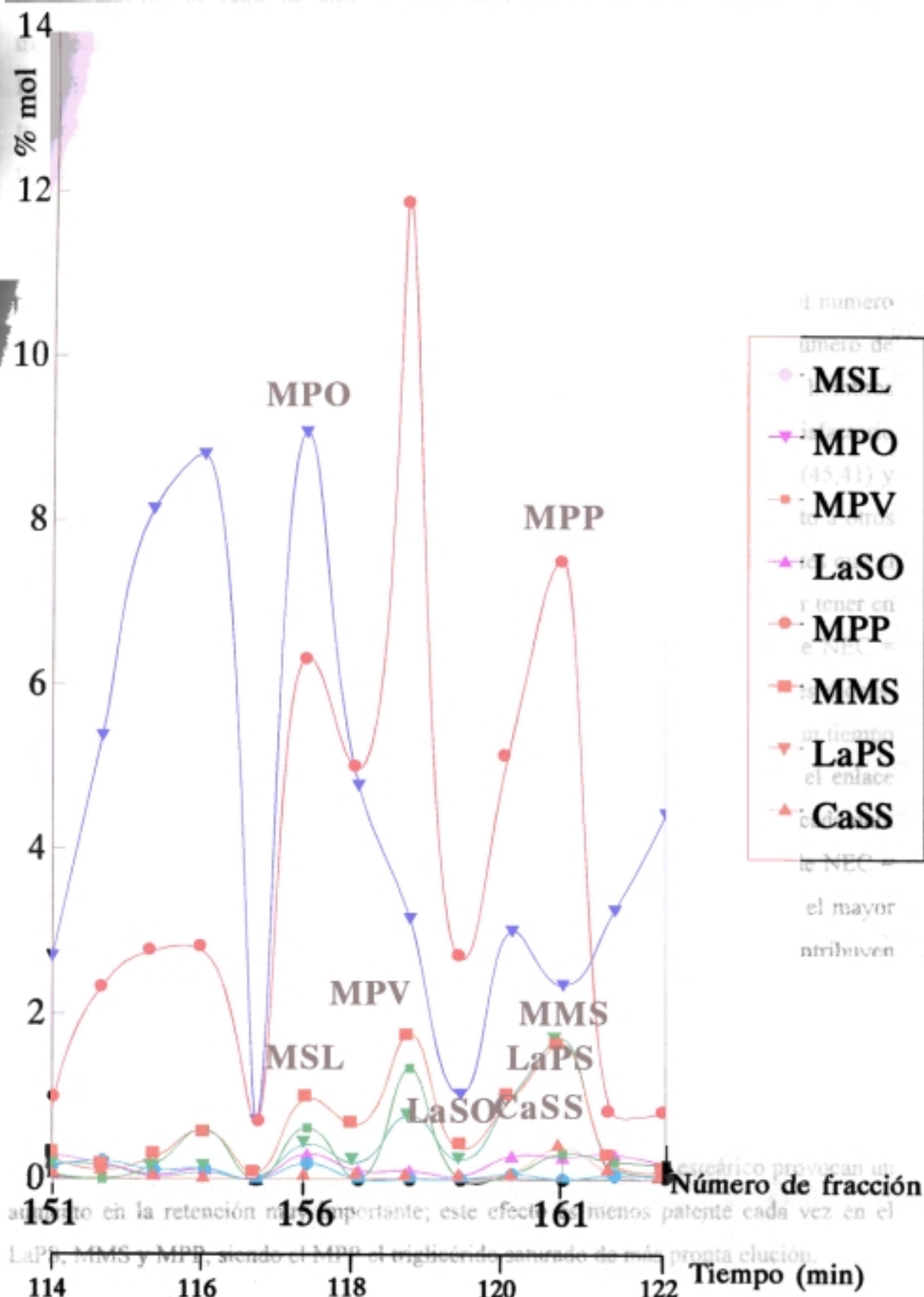


Figura 2.3.2.2f. Probabilidad de encontrar los triglicéridos de NP = 46.



se correspondió el valor de área de cada pico con el %mol aproximado de cada triglicérido. El tratamiento de desconvolución de los picos (mediante el programa PeakFit, Jandel Scientific) contribuyó a la confirmación de la existencia de los triglicéridos estimados y a proporcionarnos las áreas corregidas. El resultado obtenido tras la ordenación de los triglicéridos según su tiempo de retención, la asignación de cada uno de ellos a un pico del cromatograma y la representación del trazado de las gaussianas por la desconvolución de los picos se muestra en la figura 2.3.2.2g. Se observó que en el primer análisis por HPLC el número de especies (16) no se correspondía con el número de picos debido a la baja eficacia, pero tras la mejora de ésta se obtuvo un número de picos mayor y se observó también que algunos triglicéridos aparecían como hombros visibles de otros picos y se pudo realizar la desconvolución de un modo más satisfactorio y sencillo. El triglicérido que primero eluye es el LOO, su NEC es el menor (45,41) y todos sus ácidos grasos son insaturados, por lo que adelantan su elución respecto a otros triglicéridos con igual NEC pero con un ácido saturado (SLL). El POL eluye antes que el PSLn por la misma razón, y son el tercero y cuarto en eluir, respectivamente, por tener en NEC mayor a los anteriores (45,56). En tercer lugar eluyen los triglicéridos de NEC = 45,71: MOO, PPaO, MOV, PPL y MSL por este orden, según las razones antes dichas. Se asignó la elución del PPaO antes que el MOV por tener el máximo %mol en un tiempo anterior. El MOV eluye posteriormente al MOO por la retención que provoca el enlace *trans*, además de que lo corrobora la distribución de los porcentajes molares de cada uno. Estas mismas explicaciones son las que ordenan la elución de los triglicéridos de NEC = 45,85 y que es, respectivamente: MPO, MPV y LaSO; además, el LaSO posee el mayor tiempo de retención debido a que los ácidos grasos saturados de mayor NC contribuyen en modo más marcado a aumentar los tiempos de retención que los ácidos grasos saturados de menor NC contribuyen a reducirlo. El orden asignado a los triglicéridos saturados (NEC = 46) es el siguiente: MPP, MMS, LaPS y CaSS. Indudablemente, el MPP es el triglicérido mayoritario y esto se refleja claramente en los resultados de los % molares. El último pico en eluir es el CaSS, sus dos restos de ácido esteárico provocan un aumento en la retención muy importante; este efecto es menos patente cada vez en el LaPS, MMS y MPP, siendo el MPP el triglicérido saturado de más pronta elución.

Se identificaron 181 especies moleculares de triglicéridos; 79 de ellas fueron saturadas, 44 monoinsaturadas y 58 poliinsaturadas. La mayoría de las especies insaturadas contuvieron un solo ácido graso insaturado (61), 41 contuvieron dos, y 5 tuvieron los tres ácidos grasos insaturados. Además, se identificaron 10 triglicéridos de NC impar, bien lineales, bien ramificados. Las especies estimadas quedan recogidas en la tabla 2.3.2.2e.

De las 181 especies moleculares, 151 se habían previamente citado en la bibliografía sobre componentes de la grasa láctea por Barrón y col. (1990), Bornaz y col., (1992) y Myher y col. (1993). Las otras treinta especies restantes han sido descritas por primera vez en este análisis.

Debido al hecho de que la identificación de triglicéridos se basó no solamente en la estimación del NEC sino también en el análisis por GC de fracciones obtenidas tras una separación por HPLC, algunas de las especies descritas previamente por otros autores no se encontraron en este estudio. Este es el caso del estudio llevado a cabo por Bornaz y col. (1992), que describió la identificación de 26 especies moleculares que contenían ácido linolénico. Sin embargo, nuestro estudio solamente ha permitido poner de manifiesto nueve de ellas, ya que contenían otros ácidos grasos que se encontraron en mayores cantidades. El resto de especies no se ha mostrado en los resultados por encontrarse en un porcentaje menor al 0,01% del total de triglicéridos en cada fracción.

Nuestros resultados coinciden con los de Myher y col. (1993) en la identificación de triglicéridos con ácidos grasos de cadena impar (NC = 15 y 17), tanto lineales como ramificados; esto se debe principalmente a la mejora de los análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos por GC. Inclusive, en este estudio ha sido posible la diferenciación entre isómeros *iso* y *anteiso*, no sólo en el análisis GC de los ácidos grasos, sino también en la estimación de las especies moleculares de los triglicéridos. Los ácidos tridecanoico y nonadecanoico fueron analizados por GC, pero no se incluyeron en

Tabla 2.3.2.2. Triglicéridos estimados en grasa láctea de oveja.

Nº Pico	t <sub>r</sub>	TG	Nº Pico	t <sub>r</sub>	TG	Nº Pico	t <sub>r</sub>	TG
1	15,658	BuBuP	47	63,140	BuPO	75	102,663	CIPS
2	16,602	CoCoM			BuPV			CaMS
		BuClM	48	64,758	CoMP	76	103,922	CoSS
3	17,592	BuCoP			CaCaP	77	105,654	OLL
4	19,017	BuBuS	49	65,084	BuPP			OOLn
5	21,282	BuCaL			BuMS			SLLn
		BuClO	50	66,858	CoPdO			PaOL
6	22,614	BuCaM			Buai/MaO			PLL
7	23,045	BuClP			Bu/MaO			POLn
8	23,927	BuCoS			BuMaO	78	106,976	MOL
9	26,805	CoClO	51	67,890	LaLaLa	79	108,222	MPaO
10	27,632	BuCaO			CaLaM			LaOO
11	28,112	CoClP			ClLaP			MiPO
12	29,017	BuLaM			CoLaS			MPL
13	29,329	BuCaP	52	71,308	CaOLn	80	109,040	MMO
14	29,908	BuClS	53	71,958	ClOL			LaPO
15	31,033	BuLaPd	54	72,470	CoOO	81	110,317	MMP
16	33,300	CoMiL	55	73,279	CoSL			LaPP
17	34,008	BuML			CaML	82	111,485	LaMS
18	34,258	CoCaO			ClPL	83	112,727	CaPS
19	34,782	BuLaO	56	75,253	CoPO	84	114,098	ClSS
		BuMiP			BuSO	85	115,205	LOO
20	35,393	ClCaM	57	76,827	ClMO			SLL
		CoLaM			ClLaS			POL
21	36,213	CoCaP			CaMPa	86	116,833	PSLn
22	37,427	BuMM	58	77,800	LaLaM	87	117,232	MOO
		BuLaP			CaMM	88	118,050	PPaO
23	38,242	BuCaS	59	79,345	ClMP			MOV
24	41,992	CaLnLn			CoPP	89	119,204	PPL
25	42,344	CoOLn			BuPS			MSL
		BuOL			CaLaP			MPO
		ClMiPa	60	81,592	CaPaO			MPV
26	42,922	CaCaL	61	83,021	ClOO	90	120,220	LaSO
		ClLaL	62	84,705	LaML	91	121,571	MPP
27	44,349	CoML			CaPL			MMS
		BuPL	63	85,931	LaLaO			LaPS
28	45,006	ClCaO	64	87,193	CaMO			CaSS
29	45,983	CoLaO			CaMV	92	123,374	OOO
30	46,495	BuMO	65	88,462	ClPO	93	123,883	LOS
		BuPPa			CoSO	94	125,013	POO
31	48,725	BuMiS	66	90,191	LaLaP	95	125,831	SLP
32	49,650	N.I.			LaMM	96	127,079	PPO
33	51,119	CaLaLa			CaMP	97	127,975	MSO
34	51,962	CaCaM			CaLaS			PPV
35	52,596	ClLaM			ClMS	98	129,358	PPP
36	53,191	ClClS			ClPP			MPS
37	54,027	ClCaP	67	91,679	CoPS	99	131,123	LaSS
38	54,619	CoLaP			BuSS	100	132,587	SOO
		CoMM			CaPd	101	133,421	SOV
39	55,908	CoCaS	68	93,723	CaOO	102	134,924	PSO
40	56,421	BuMP			LaOL	103	135,978	PSV
		BuLaS	69	95,348	LaPL	104	137,041	N.I.
41	57,425	BuaiPdP			MML	105	138,014	PPS
		BuPdP			CaSL	106	139,829	MSS
		CaCaPd	70	96,852	LaMO	107	143,005	PdSS
42	59,550	ClOLn	71	97,712	CaPO	108	144,391	SSO
		CoOL	72	98,925	ClSO	109	145,142	SSV
43	59,746	CaMLn			MMiP	110	148,111	PSS
44	60,449	BuOO	73	99,827	MMM	111	160,683	SSS
45	60,817	BuOV			LaMP			
46	62,248	CoPL	74	101,043	CaPP			
		CoMO			LaLaS			

TG = triglicérido; N.I. = no identificado.

la estimación de triglicéridos debido a las bajas cantidades en que se encontraron en el contenido total de la grasa láctea.

Igualmente al estudio de Barrón y col (1990), se tuvo en cuenta el ácido *trans*-vaccénico por encontrarse en un 1,36% en el análisis de ácidos grasos en la fracción triglicérica total. Sin embargo, hay que resaltar que en el estudio antes mencionado solamente se describen 116 especies moleculares de triglicéridos, en lugar de las 181 de nuestro estudio, debido a que tan solo consideraron 14 ácidos grasos para la realización de los cálculos de los triglicéridos a causa de la menor sensibilidad de su análisis por GC.

#### 2.3.4- Comparación de la composición en triglicéridos de la grasa de leche de oveja, cabra y vaca.

La figura 2.3.4a reúne los cromatogramas de triglicéridos de leche de vaca, oveja y cabra y como se puede observar, las diferencias son solamente cuantitativas. Expresados en porcentajes de área, los resultados son los recogidos en la tabla 2.3.4. La figura 2.3.4b muestra los resultados referentes al NEC y también al grado de saturación de los triglicéridos.

Tabla 2.3.4. Áreas (%) de los triglicéridos de la grasa de leche de vaca, oveja y cabra en función de su NEC.

	NEC ≤ 34	34 < NEC ≤ 40	NEC > 40	Total
Vaca	10,83	25,16	64,01	100
Oveja	18,23	32,84	48,93	100
Cabra	15,21	30,83	53,96	100

La leche de vaca es la que posee la mayor proporción de triglicéridos de NEC > 40, seguido de la leche de cabra y la de oveja respectivamente. Sin embargo, la leche de

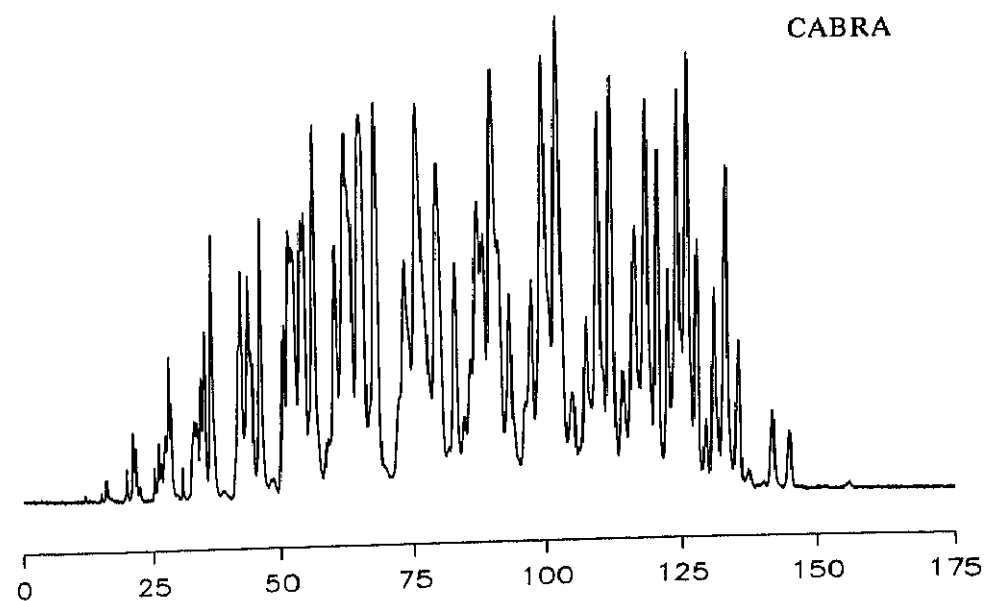
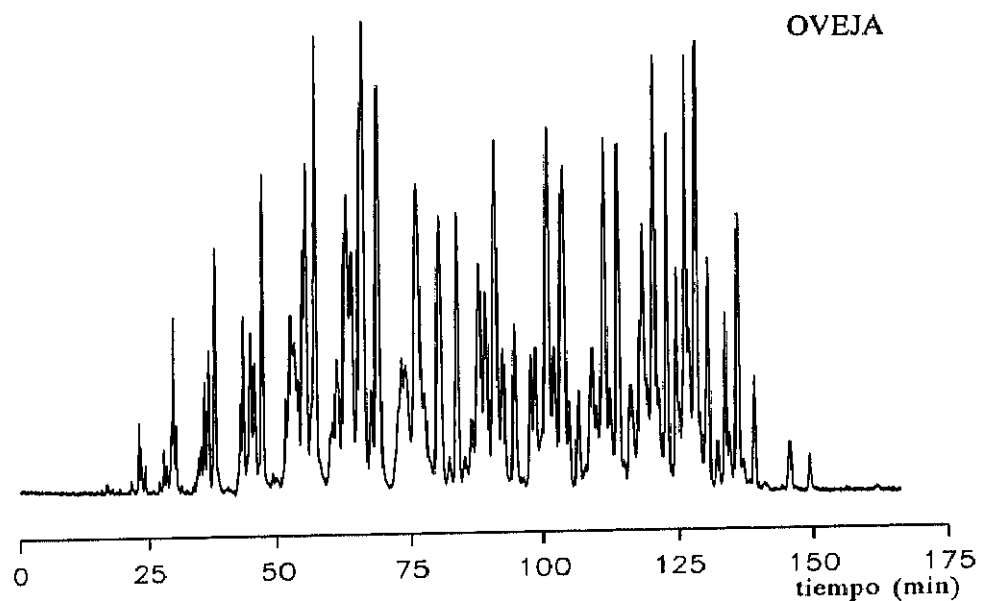
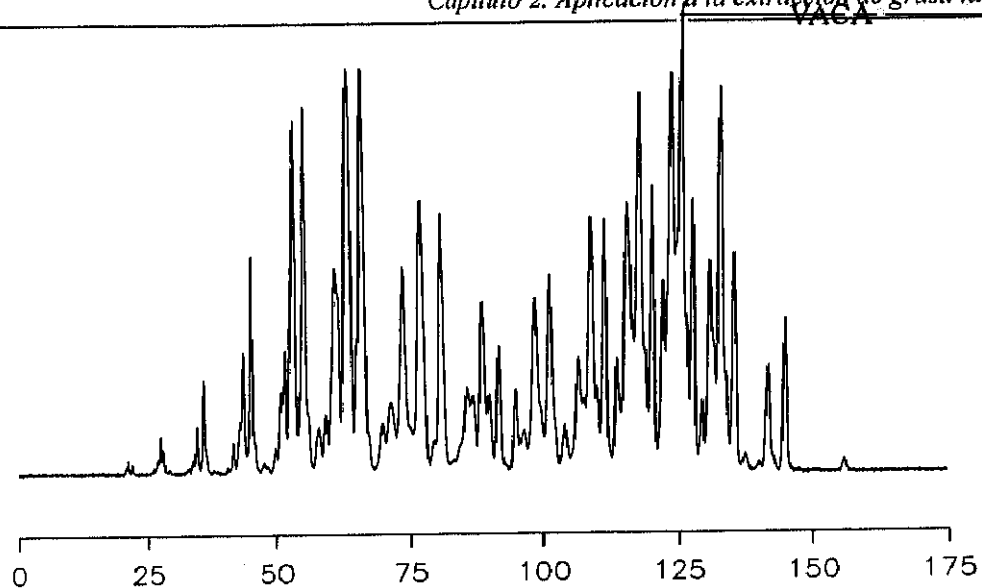


Figura 2.3.4a. Cromatogramas de HPLC de triglicéridos de leche de vaca, oveja y cabra.



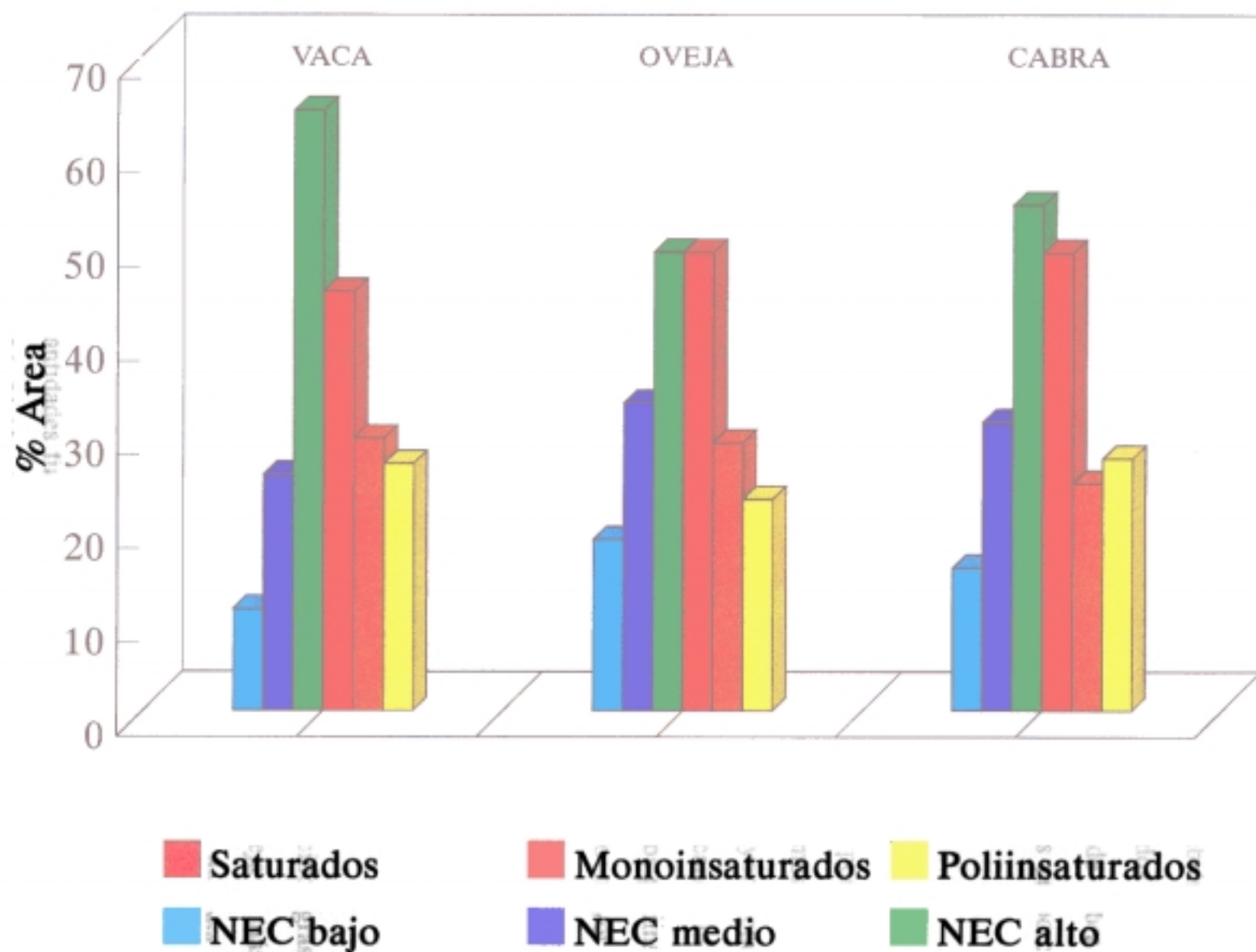


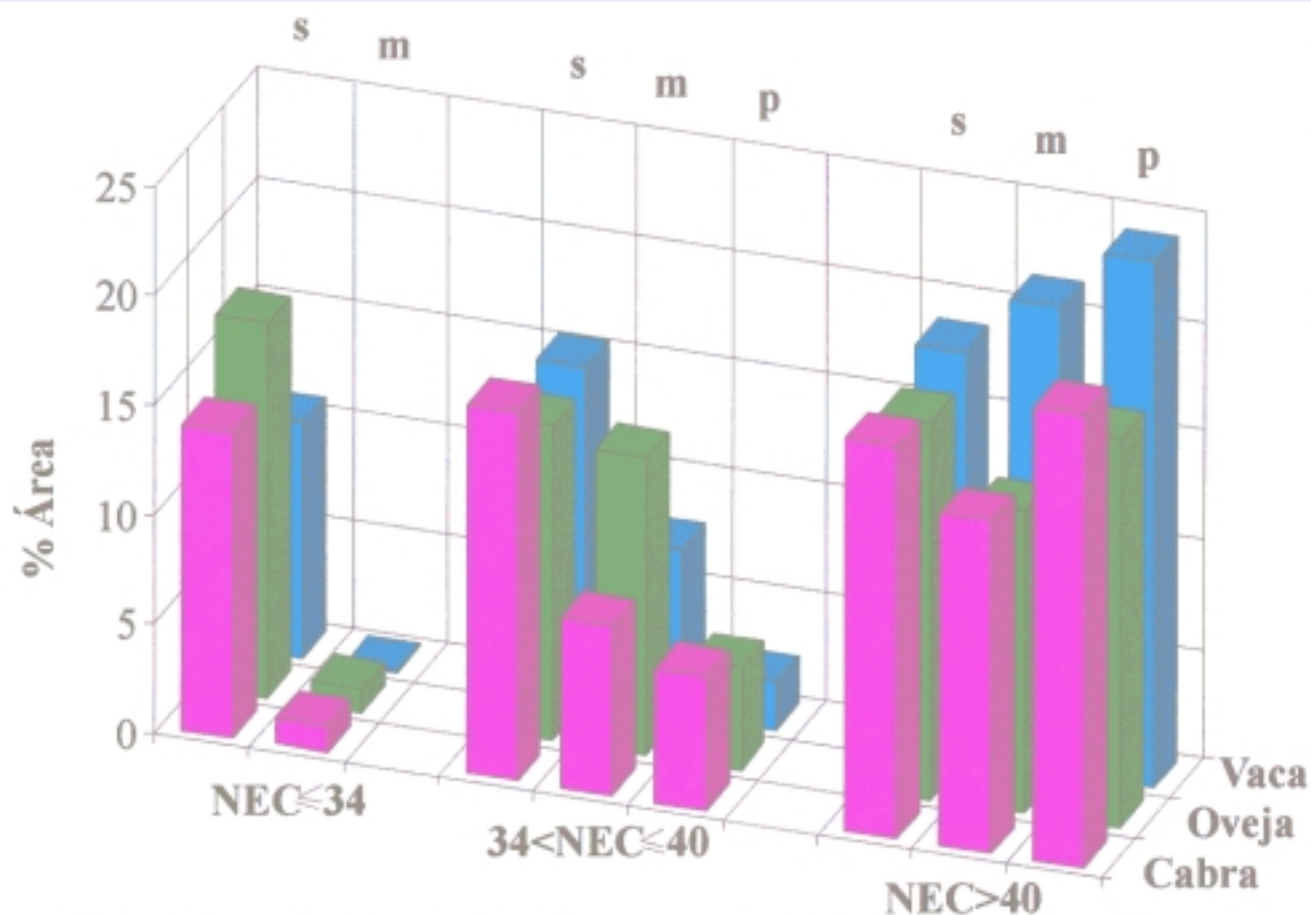
Figura 2.3.4b. Composición de la grasa de leche de vaca, oveja y cabra en función de su NEC y grado de saturación.

oveja es la más enriquecida en triglicéridos de  $NEC \leq 40$ , delante de la de cabra y la de vaca, por este orden. En cualquiera de las tres especies, la grasa láctea posee mayor proporción de triglicéridos de  $NEC > 40$  que del resto de triglicéridos, la menor proporción de triglicéridos está cuando éstos son de  $NEC \leq 34$ , también para las tres especies animales. Estas diferencias entre las proporciones de triglicéridos según su NEC son más patentes para la leche de vaca y menores para la leche de cabra y oveja respectivamente; en esta última existe una mayor equiparación de las proporciones de triglicéridos en función de sus NEC.

Los triglicéridos saturados son los mayoritarios en la grasa láctea de las tres especies animales. Entre las leches de las tres especies, es la de vaca la que posee una menor proporción respecto a la de cabra y oveja, siendo entre estas dos últimas la proporción muy semejante. Los triglicéridos monoinsaturados se encuentran en mayor proporción en la leche de vaca, teniendo la leche de oveja valores menores pero cercanos; la leche de cabra posee la menor proporción de estos triglicéridos. Los triglicéridos poliinsaturados están en la leche de cabra en la mayor proporción (siendo incluso mayor a la de triglicéridos monoinsaturados), con un porcentaje ligeramente menor en la leche de vaca; la leche de oveja es la que menos proporción de triglicéridos poliinsaturados posee. En las leches de vaca y oveja, existen más cantidad de triglicéridos monoinsaturados que poliinsaturados, al contrario de lo que ocurre en la leche de cabra.

Estos resultados pueden explicarse basándose en la composición en ácidos grasos de la grasa láctea de estas especies (Ramos y Juárez, 1986). La leche de oveja es más rica en ácidos grasos de cadena corta ( $NC \leq 8$ ) y poliinsaturados, y la leche de vaca lo es en ácidos grasos saturados de cadena larga ( $NC \geq 16$ ). Se confirmó que la leche de vaca poseía la mayor cantidad de triglicéridos insaturados, debido a la mayor cantidad de ácido oleico; mientras que las cantidades fueron inferiores en leche de oveja y cabra, aunque semejantes entre ellas (55,31, 51,12 y 51,13%, respectivamente).

En la figura 2.3.4c se muestran los porcentajes de triglicéridos en función de su NEC, según sean de leche de vaca, oveja y cabra, y de acuerdo a su grado de saturación. La leche de vaca posee el mayor porcentaje de triglicéridos de  $NEC > 40$  poliinsaturada, sin embargo, la leche de cabra es la más rica en triglicéridos de  $34 < NEC \leq 40$  poliinsaturada. Estos resultados están en concordancia con las cantidades relativas de ácidos grasos de cadena corta, media ( $8 < NC \leq 12$ ) y larga y sus diferentes combinaciones para dar lugar a triglicéridos en las tres especies animales.



**Figura 2.3.4c. Composición de los triglicéridos de la grasa láctea de vaca, oveja y cabra en función de su NEC y grado de saturación.**

**TRIGLICERIDOS:**

s = saturados

m = monoinsaturados

p = poliinsaturados

## APLICACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO A LA MODIFICACIÓN DE GRASA LÁCTEA EN NATA

### 2.4- MATERIALES Y MÉTODOS

#### *2.4.1- Preparación de la muestra*

Se utilizó leche cruda de oveja proporcionada por Queserías Campo Real en Campo Real, (Madrid).

La obtención de la nata a partir de la leche se realizó según los métodos detallados en el apartado 2.2.1.

#### *2.4.2- Descripción del equipo de extracción*

Las extracciones se llevaron a cabo utilizando un extractor de fluidos supercríticos semipreparativo LDC Analytical que fue modificado previamente en el laboratorio (Hierro, 1994). La figura 2.4.2 muestra un diagrama de este equipo de extracción.

El dióxido de carbono líquido es impulsado por medio de una bomba de velocidad variable cuya cabeza se encuentra enfriada a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$  mediante un baño criogénico para mantener el  $\text{CO}_2$  en estado líquido. El  $\text{CO}_2$  a la salida de la bomba se calienta previamente a la entrada al interior de la celda de extracción (55 mL de capacidad). Esta celda de extracción posee una camisa calefactora controlada mediante una sonda termopar.

El  $\text{CO}_2$  supercrítico, que contiene el extracto lipídico, es despresurizado tras la salida de la celda a su paso por un restrictor variable. La despresurización causa el cambio a  $\text{CO}_2$  en estado gaseoso, separándose el extracto y recogiendo en un erlenmeyer a presión

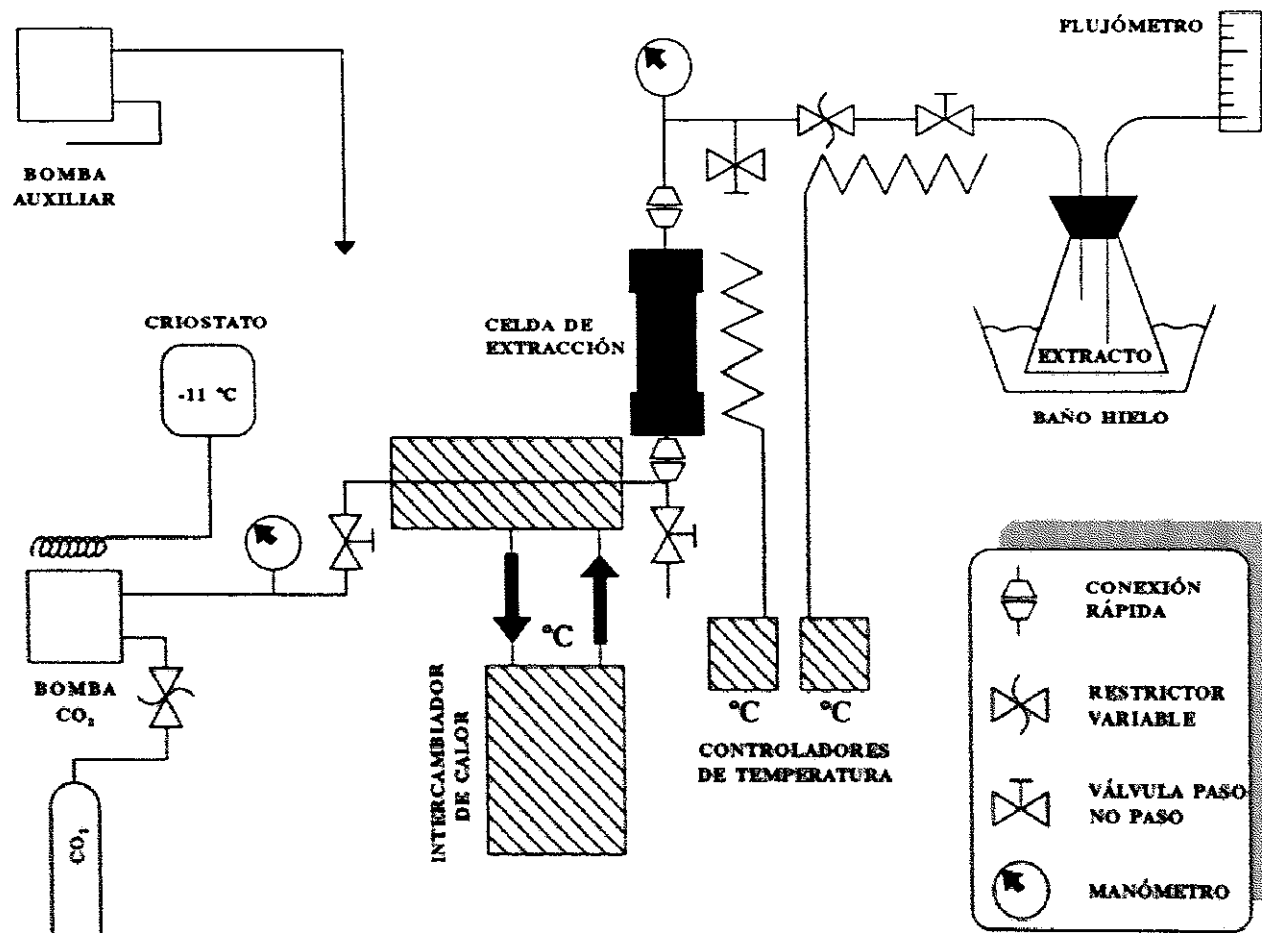


Figura 2.4.2. Esquema del extractor supercrítico semipreparativo.

atmosférica. Se evitaba la formación de nieve carbónica en el restrictor calentándolo con una resistencia.

Las extracciones se realizan en modo dinámico, controlándose el volumen de CO<sub>2</sub> y flujo para que se mantengan constantes. Las extracciones se realizaron por duplicado.

Se utilizaron 10 g de nata por extracción. La cantidad de grasa extraída se obtuvo por pesada del extracto. La cantidad de nata residual se obtuvo por diferencia entre la inicial y el extracto. Posteriormente se realizaron los análisis por HPLC de colesterol y triglicéridos de la nata antes y después de su tratamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico. También se calculó la humedad de las natas antes y después de su tratamiento.

#### *2.4.3- Optimización del flujo de CO<sub>2</sub> supercrítico*

Este estudio junto con el de la optimización del volumen de CO<sub>2</sub> se realizaron con leche de oveja anteriormente estudiada en el punto 2.2.1, cuyo contenido en colesterol de la nata fue de 2,2 mg /g.

El flujo óptimo de CO<sub>2</sub> se calculó en base a conseguir un mayor rendimiento de la extracción de colesterol. El control se hizo variando el recorrido del émbolo de la bomba para conseguir flujos entre 0,50 y 3 L/min medidos a presión atmosférica.

Las extracciones se realizaron a 21,4 MPa y 40 °C, condiciones adecuadas para la extracción de colesterol. El volumen de CO<sub>2</sub> en cada extracción fue de 400 L. Posteriormente se realizaron los análisis de colesterol por HPLC.

#### ***2.4.4- Optimización del volumen de CO<sub>2</sub> supercrítico***

Se calculó el volumen necesario para extraer un máximo de colesterol. Las condiciones de extracción fueron de 17,9 MPa y 40 °C manteniendo el flujo óptimo obtenido previamente.

Se estudiaron volúmenes de CO<sub>2</sub> de 100 a 700 L medidos a presión atmosférica. Posteriormente se analizó por HPLC el colesterol extraído.

#### ***2.4.5- Determinación de la grasa de la nata***

La grasa de la nata previamente a la extracción con CO<sub>2</sub> se determinó por extracción sólido-líquido, utilizando 75 mL de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1) en un Soxhlet durante 1 h para extraer la grasa contenida en 1 g de nata. Después se evaporó el disolvente en atmósfera de N<sub>2</sub> y se determinó la grasa gravimétricamente por pesada del residuo.

Tras la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, el peso del extracto correspondía al de la grasa extraída.

#### ***2.4.6- Medida de la humedad de la nata***

El agua contenida en la nata podía actuar como modificador en la extracción de la grasa; es por esto que se decidió analizar la humedad de la nata original y del residuo tras la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. Además, el agua puede ser coextraída con los componentes lipídicos mediante un proceso de arrastre de vapor, por lo que su contenido en la nata tratada podría variar con las condiciones de extracción.



La medida de la humedad de la nata se realizó a partir de 400 mg de muestra siguiendo el método oficial de la AOAC (1990), en estufa a 100 °C. Se calculó la humedad en porcentaje por diferencia con el peso al cabo de 1 h.

#### ***2.4.7- Análisis de colesterol por cromatografía líquida de alta eficacia***

##### **2.4.7.1- Obtención de la fracción insaponificable de la nata**

La separación de la fracción insaponificable de la grasa de la nata es necesaria para el análisis de colesterol por HPLC, puesto que los componentes mayoritarios, los triglicéridos, interfieren en el análisis (Hurst y col., 1983).

A 1 g de nata (tratada o no con CO<sub>2</sub> supercrítico) se le añaden 50 mL de KOH metanólica 2N preparada en el día. En ese momento también se añaden 400 µL de estigmasterol (patrón interno) de una solución de 2,5 mg/mL de hexano para conseguir una concentración de 1 mg/g nata. Esta mezcla se pone a calentar a reflujo durante 30 min.

La solución restante se lleva a un embudo de decantación, y el matraz se lava con dos porciones de 25 mL de agua destilada que también se llevan al embudo. Se añaden 10 mL de una solución de NaCl al 10% para facilitar la separación de las fases y se extrae con dos porciones de 100 mL de éter etílico/éter de petróleo (1:1). Se recogen las fases etéreas y se llevan a sequedad con un rotavapor a 30 °C. Después, esta fracción se redisuelve en 5 mL de éter de petróleo, se pasa por un filtro de 0,2 µm y se inyectan 20 µL en el HPLC.

#### 2.4.7.2- Análisis de colesterol por HPLC

El sistema cromatográfico utilizado consistió en una bomba modelo 6000A (Waters Assoc.), un inyector Rheodyne modelo 7125 con un bucle de carga de 20  $\mu$ L, un horno para la columna (Kariba Instruments) y un detector ultravioleta de longitud de onda variable 3100X (LDC Analytical), conectados a un sistema de adquisición de datos System Gold (Beckman) a través de una interfase modelo 406 (Beckman). Se utilizó una columna Spherisorb ODS-2 (Phase Separations) de 5  $\mu$ m de diámetro de partícula y 4,6 mm  $\times$  20 cm de tamaño mantenida a una temperatura constante de 45 °C.

Los análisis se realizaron en condiciones isocráticas a un flujo de 2 mL/min y detección en UV a 205 nm. La fase móvil fue hexano/isopropanol en la proporción 99,9:0,1.

#### *2.4.8- Análisis de triglicéridos por cromatografía líquida de alta eficacia*

La extracción de los triglicéridos de la grasa de la nata (tanto tratada con CO<sub>2</sub> supercrítico como no) y su posterior análisis por HPLC se realizaron según se detalla en los apartados 2.2.1 y 2.2.2 respectivamente.

#### *2.4.9- Efecto de la presión y la temperatura en la extracción de grasa de nata sin y con adición de bolas de vidrio*

Los 10 g de nata se sometieron a la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico con las siguientes condiciones de presión y temperatura:

- temperaturas de 40, 50 y 60 °C.
- presiones de 8,3; 9,7; 14,5; 17,2; 19,3; 24,1; 29,0 y 33,8 MPa.

El volumen de CO<sub>2</sub> de cada extracción fue de 350 L y el flujo medido a presión atmosférica de 1,5-2 L/min. Las extracciones se realizaron en cada condición por duplicado.

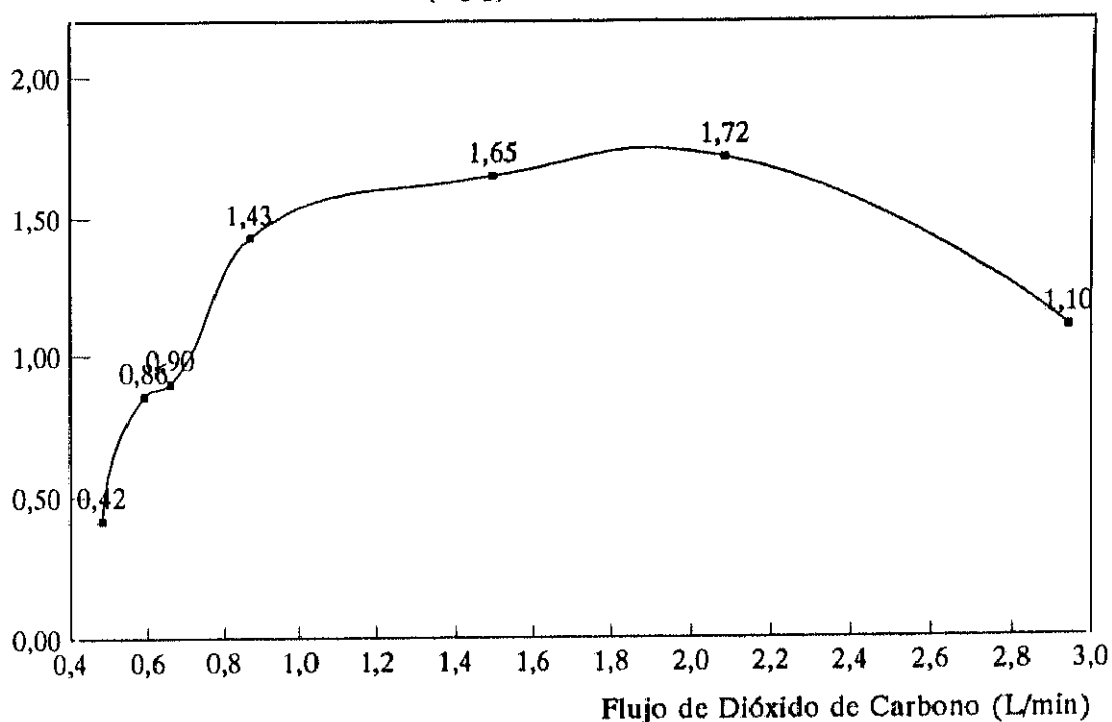
Posteriormente, y a la vista de los resultados, se realizó una segunda serie de duplicados añadiendo 100 bolitas de vidrio de 4 mm de diámetro como dispersantes de la nata para aumentar la superficie de contacto con el CO<sub>2</sub> y evitar la formación de canales preferenciales.

## **2.5- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

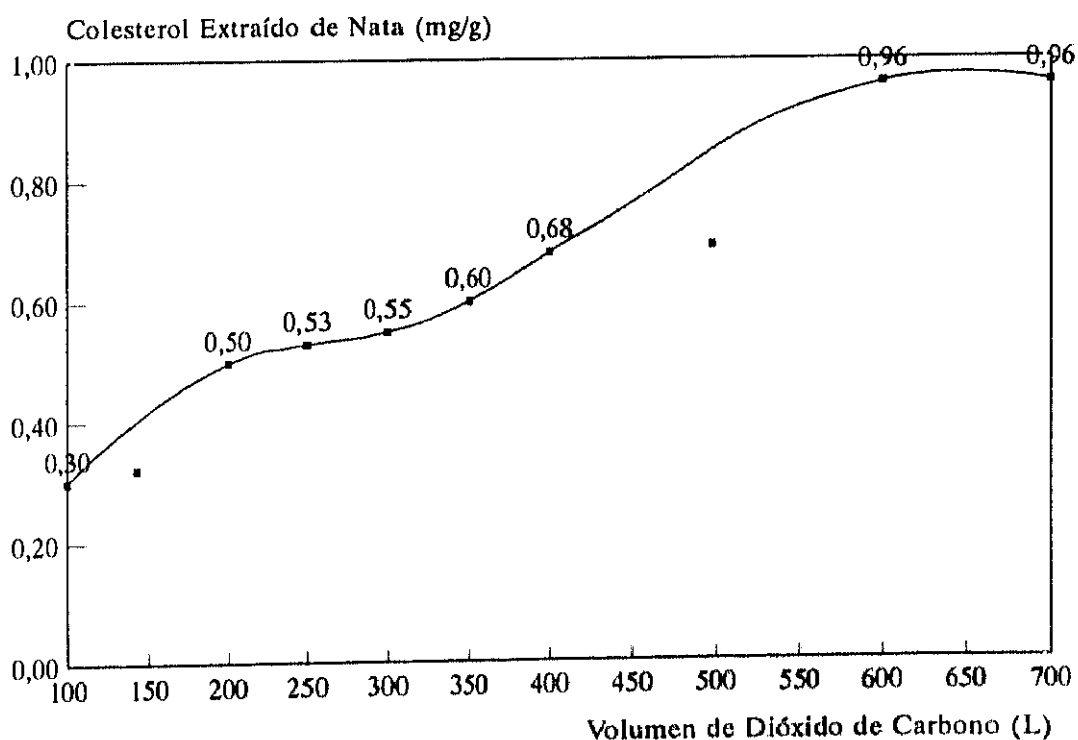
### ***2.5.1- Optimización del flujo de CO<sub>2</sub> supercrítico***

La variación de la potencia de la bomba entre porcentajes del 30 y 100% del recorrido total del émbolo proporcionaron flujos comprendidos entre los 0,4 y 3 L/min, medidos a presión atmosférica. La figura 2.5.1 muestra la variación de la cantidad de colesterol extraído respecto a la variación del flujo proporcionado por la bomba. Como se puede observar se alcanza un máximo de colesterol extraído a flujos comprendidos entre 1,5 y 2,2 L/min, siendo los valores mayores obtenidos en los análisis de 1,65 y 1,75 mg/g nata.

Se concluyó que la mayor extracción de colesterol se producía consiguiendo flujos de CO<sub>2</sub> entre 1,5 y 2 L/min. Flujos inferiores producían extracciones menores de colesterol debido a la lenta renovación de CO<sub>2</sub> y su consiguiente mayor grado de saturación de colesterol, a 0,48 L/min se produjo la menor extracción con 0,42 mg colesterol extraído/g nata. Flujos superiores a 2 L/min eran demasiado altos para un buen intercambio de colesterol entre la nata y el CO<sub>2</sub>, la extracción descendió hasta 1,10 mg/g con el flujo de 2,94 L/min.



**Figura 2.5.1. Influencia del flujo de dióxido de carbono en la extracción de colesterol**



**Figura 2.5.2. Influencia del volumen de dióxido de carbono en la extracción de colesterol**

### ***2.5.2- Optimización del volumen de CO<sub>2</sub> supercrítico***

Se observó que, en las condiciones estudiadas, la extracción de colesterol aumentaba conforme lo hacía el volumen de CO<sub>2</sub> hasta llegar a los 600 L (figura 2.5.2). A partir de este volumen la extracción de colesterol llega a un máximo, tras el que un aumento de volumen no produce una mayor cantidad de colesterol extraída, siendo este máximo de 0,96 mg/g nata.

Se eligió realizar las siguientes extracciones con volúmenes de 350 L de CO<sub>2</sub>. Volúmenes superiores alargan excesivamente la duración de la extracción (más de 4 h), no siendo viable la realización del estudio planteado. Además, tiempos prolongados de extracción conducen a la extracción máxima de todos los compuestos de la grasa láctea, siendo la extracción selectiva de colesterol menor respecto a la de los triglicéridos. Estas conclusiones se vieron corroboradas por los resultados posteriores de extracción de grasa total, colesterol y la selectividad conseguida (apartados 2.5.3, 2.5.5 y 2.5.7).

Así pues, las siguientes extracciones se realizaron con un flujo de 1,5-2 L CO<sub>2</sub>/min consumiendo 350 L.

### ***2.5.3- Efecto en la extracción de grasa***

La muestra de nata de la que se partió tenía un contenido en grasa del 69%.

En las tabla 2.5.3 a y b se indican las masas de extracto obtenidas para cada condición de presión y temperatura y para extracciones realizadas sin y con presencia de bolas de vidrio respectivamente. También se indica la solubilidad de la grasa en cada extracción expresada como mg grasa/L CO<sub>2</sub>. En las figuras 2.5.3 a y b se representa la cantidad de

**Tabla 2.5.3a.** Masa y solubilidad de la grasa extraída sin bolas de vidrio.

Presión <sup>2</sup>	Temperatura <sup>1</sup>					
	40		50		60	
	Extracto <sup>3</sup>	Solubilidad <sup>4</sup>	Extracto	Solubilidad	Extracto	Solubilidad
8,3	0,14	0,40	0,14	0,40	0,03	0,09
9,7	0,5	1,43	-	-	0,02	0,06
14,5	2,53	7,23	0,58	1,66	0,29	0,83
17,2	3,47	9,91	1,59	4,54	1,48	4,23
19,3	3,62	10,34	3,57	10,20	2,12	6,06
24,1	4,41	12,60	3,77	10,77	5,79	16,54
29,0	3,62	10,34	4,95	14,14	5,97	17,06
33,8	5,18	14,80	4,64	13,26	6,07	17,34

<sup>1</sup> temperatura en °C, <sup>2</sup> presión en MPa, <sup>3</sup> masa de extracto en g, <sup>4</sup> solubilidad expresada como mg grasa extraída/L CO<sub>2</sub>

**Tabla 2.5.3b.** Masa y solubilidad de la grasa extraída con bolas de vidrio.

Presión <sup>2</sup>	Temperatura <sup>1</sup>					
	40		50		60	
	Extracto <sup>3</sup>	Solubilidad <sup>4</sup>	Extracto	Solubilidad	Extracto	Solubilidad
8,3	0,05	0,14	0,07	0,20	0,04	0,11
9,7	0,08	0,23	0,15	0,43	0,16	0,46
14,5	2,36	6,74	0,75	2,14	-	-
17,2	4,57	13,06	2,09	5,97	1,37	3,91
19,3	4,46	12,74	2,96	8,46	3,05	8,71
24,1	4,60	13,14	5,17	14,77	4,63	13,23
29,0	5,10	14,57	5,71	16,31	5,73	16,37
33,8	5,81	16,60	5,54	15,83	5,25	15,00

<sup>1</sup> temperatura en °C, <sup>2</sup> presión en MPa, <sup>3</sup> masa de extracto en g, <sup>4</sup> solubilidad expresada como mg grasa extraída/L CO<sub>2</sub>

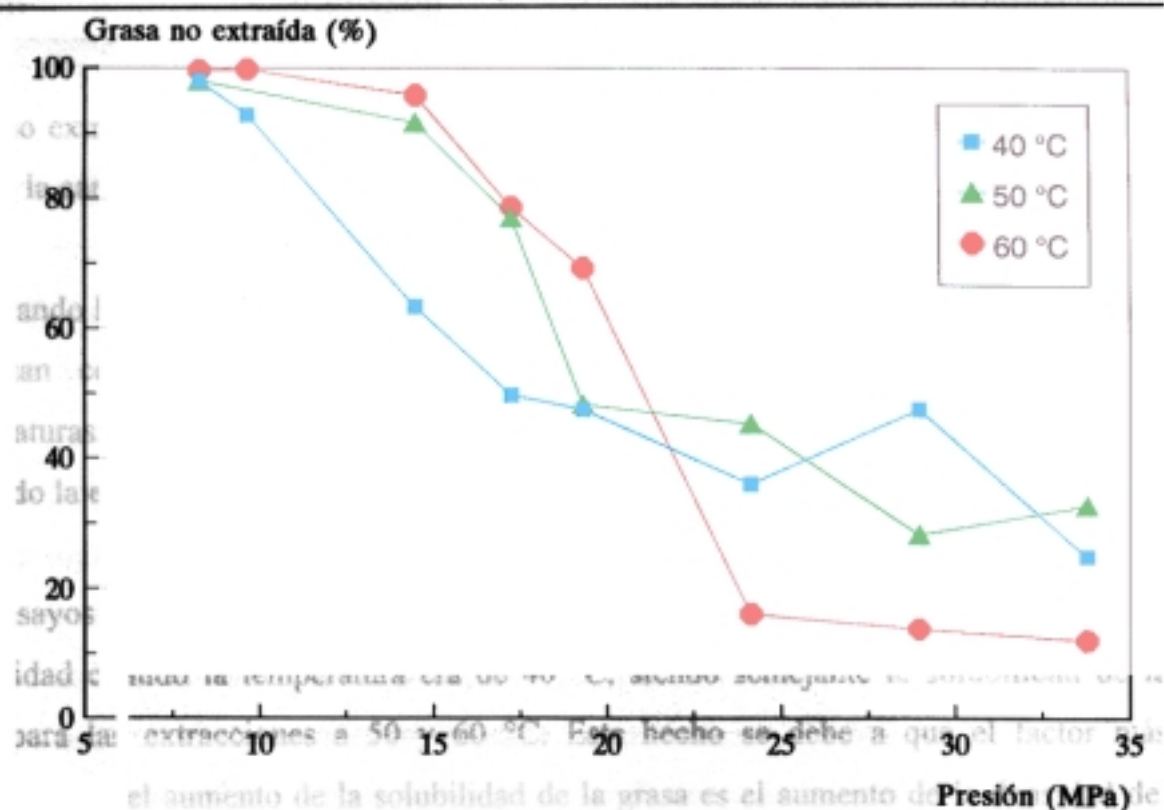


Figura 2.5.3a. Porcentaje de grasa no extraída sin bolas de vidrio

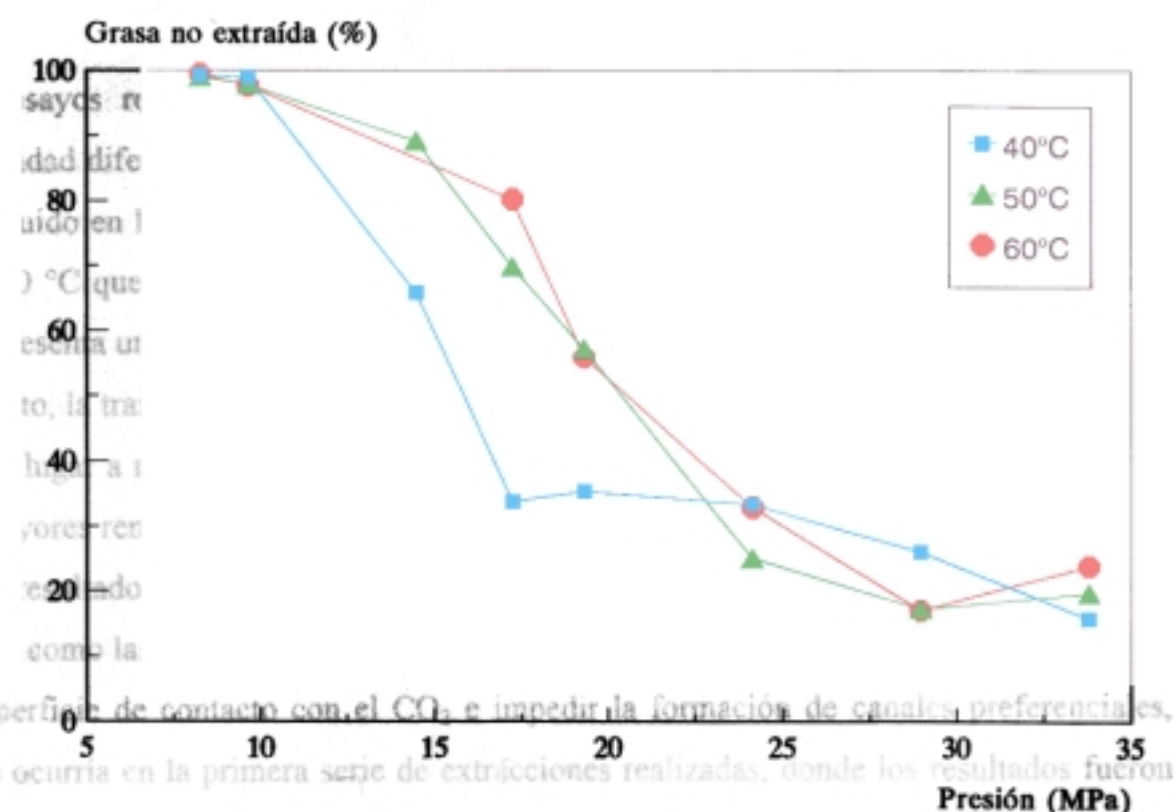


Figura 2.5.3b. Porcentaje de grasa no extraída con bolas de vidrio

grasa no extraída, estimada por diferencia entre el contenido de grasa de la muestra sin tratar y la cantidad de grasa extraída.

Observando los resultados se aprecia que la solubilidad y el rendimiento de la extracción aumentan conforme aumenta la presión en el rango estudiado de presiones y temperaturas. El efecto de la temperatura varía dependiendo de la presión a la que se ha realizado la extracción.

Los ensayos realizados a presiones menores a 20 MPa ofrecieron mayores valores de solubilidad cuando la temperatura era de 40 °C, siendo semejante la solubilidad de la grasa para las extracciones a 50 y 60 °C. Este hecho se debe a que el factor más importante en el aumento de la solubilidad de la grasa es el aumento de la densidad del CO<sub>2</sub> supercrítico, que se produce al disminuir la temperatura a la que se somete el fluido. Los resultados coinciden con los expuestos para el estudio realizado con leche en polvo (Hierro, 1994) en condiciones semejantes y en mantequilla (Chen y col., 1992a).

Los ensayos realizados a presiones mayores de 20 MPa conducen a resultados de solubilidad diferentes según se hayan realizado con o sin bolas de vidrio. El rendimiento conseguido en los primeros ensayos, sin bolas de vidrio, es menor a las temperaturas de 40 y 50 °C que a 60 °C. Este comportamiento se debe a que a la mayor temperatura la nata presenta un estado más fluido, menos compactado, facilitando la difusión del CO<sub>2</sub> y, por tanto, la transferencia de masa. Los segundos ensayos, realizados con bolas de vidrio, dieron lugar a rendimientos semejantes entre sí y la extracción anterior a 60 °C. Fueron los mayores rendimientos que se pudieron conseguir en todas las extracciones realizadas. Estos resultados mostraron definitivamente la efectividad de la adición de un soporte sólido, como las bolas de vidrio, para conseguir una mejor dispersión de la nata, aumentar la superficie de contacto con el CO<sub>2</sub> e impedir la formación de canales preferenciales, como ocurría en la primera serie de extracciones realizadas, donde los resultados fueron menos satisfactorios. El efecto del aumento de superficie de contacto con el CO<sub>2</sub> coincide con el conseguido por Snyder y col. (1984) para la obtención de aceite de soja a partir de



grano entero, copos o harina. Estos autores no sólo resaltan la importancia de aumentar la superficie, sino también la de impedir la compresión de la muestra con el aumento de la presión, que daría lugar a aparición de canales preferenciales y zonas inaccesibles al fluido. De este modo, las bolas de vidrio constituyen un soporte que aumenta la superficie de la nata y, a la vez, es sólido, inerte y resistente a la presión.

En estas condiciones de presión mayor a 20 MPa se observó que el efecto de la densidad sobre la solubilidad de la grasa era contrarrestado por el efecto de la presión de vapor de los compuestos extraídos. A estas presiones el efecto del aumento de la presión de vapor sobre la solubilidad adquiere más importancia que el efecto de la disminución de la densidad del CO<sub>2</sub> al aumentar la temperatura, contrariamente a como ocurrió a presiones menores a 20 MPa. Este hecho produce que el rendimiento de la extracción a 60 y 50 °C se iguale al conseguido a 40 °C. Shishikura y col. (1986) observaron que la extracción de los lípidos disminuía al aumentar la presión utilizando mantequilla, mientras que la extracción aumentaba de forma lineal en el caso de la grasa anhidra, suponiendo la presencia de agua como la causa de las diferencias encontradas. Sin embargo, estos resultados difieren de los obtenidos en el presente trabajo, siendo intermedios entre los de grasa anhidra y mantequilla en el estudio antes mencionado. Los resultados distintos pueden suponer que el signo de la emulsión es también un factor a tener en cuenta a la hora de elegir un sustrato para la extracción. Los resultados también difieren de los obtenidos por Yu y col. (1992) con grasa anhidra, la extracción de grasa fue siempre menor a 60 °C que a 40 °C incluso a las más altas presiones (31 Mpa).

En la tabla 2.5.3c se indican las densidades de CO<sub>2</sub> supercrítico que existen en las diferentes condiciones de presión y temperatura calculadas según la modificación de Pitzer sobre la ecuación de los gases ideales (Pitzer, 1955; Pitzer y col., 1955).

**Tabla 2.5.3c.** Densidades de CO<sub>2</sub> supercrítico en las condiciones de estudio (SF-Solver™, Program Isco, Inc.).

Presión (MPa)	Densidad (g/mL)		
	40 °C	50 °C	60 °C
8,3	0,34	0,24	0,20
9,7	0,56	0,35	0,27
14,5	0,78	0,69	0,58
17,2	0,82	0,75	0,67
19,3	0,84	0,78	0,72
24,1	0,88	0,83	0,78
29,0	0,91	0,87	0,83
33,8	0,94	0,90	0,86

Teniendo en cuenta únicamente las densidades de cada extracción en la variación de la solubilidad de la grasa se observa que, se produce un rápido aumento de la solubilidad a partir de 0,62 g/mL para la temperatura de 60 °C, 0,69 g/mL para 50 °C y 0,78 g/mL para 40°C, siendo este aumento semejante en las tres temperaturas, aunque la solubilidad a 60 °C es mayor a una densidad constante debido al aumento de la presión de vapor de los componentes del extracto, que se suma al efecto de la densidad (figura 2.5.3c). Los resultados de Yu y col., (1992) difieren con los del presente estudio en resaltar una densidad tras la cual se experimentaba un rápido aumento de la densidad y que es de 0,5 g/mL para 40 °C y 0,6 para 60 °C, no observándose en el estudio influencia del aumento de la presión de vapor al aumentar la temperaturas incluso a densidades altas.

#### **2.5.4- Efecto sobre la humedad de la nata**

El contenido de agua de la nata una vez tratada con CO<sub>2</sub> supercrítico también es dependiente de la presión y temperatura de las extracciones. La humedad de la nata varía

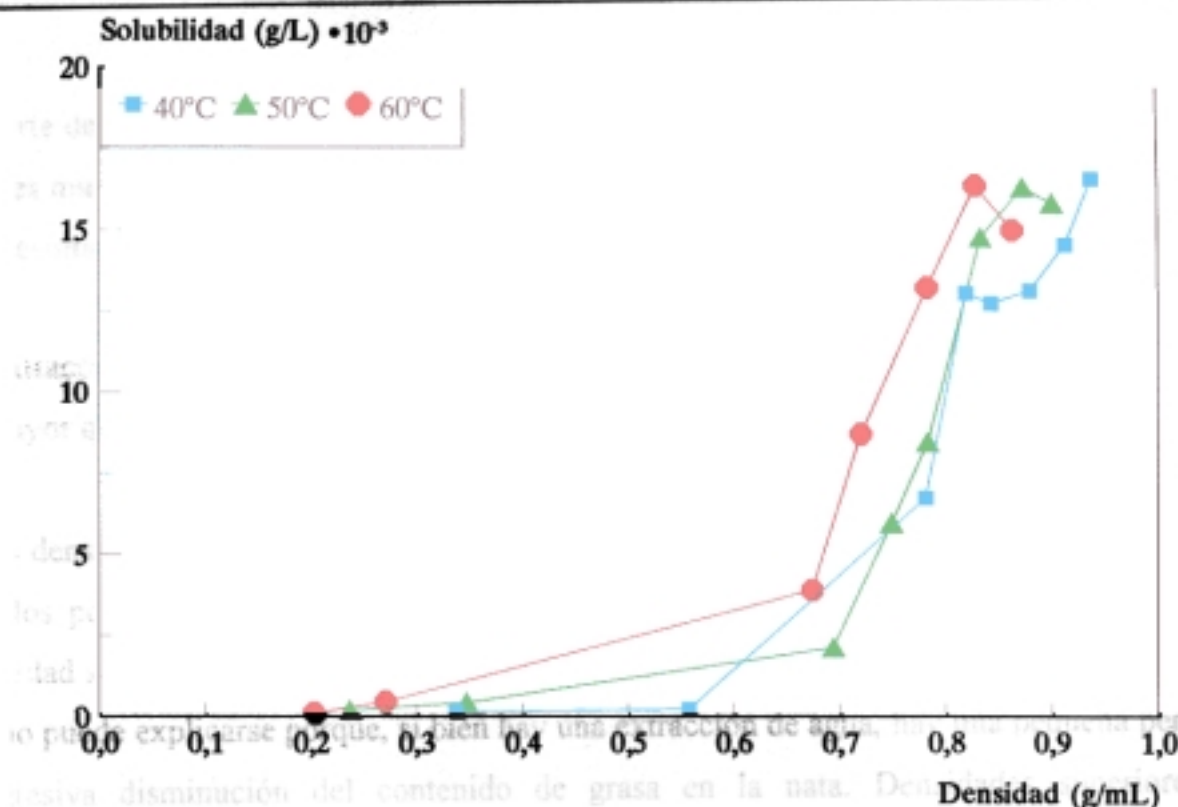


Figura 2.5.3c. Efecto de la densidad del dióxido de carbono supercrítico en la solubilidad

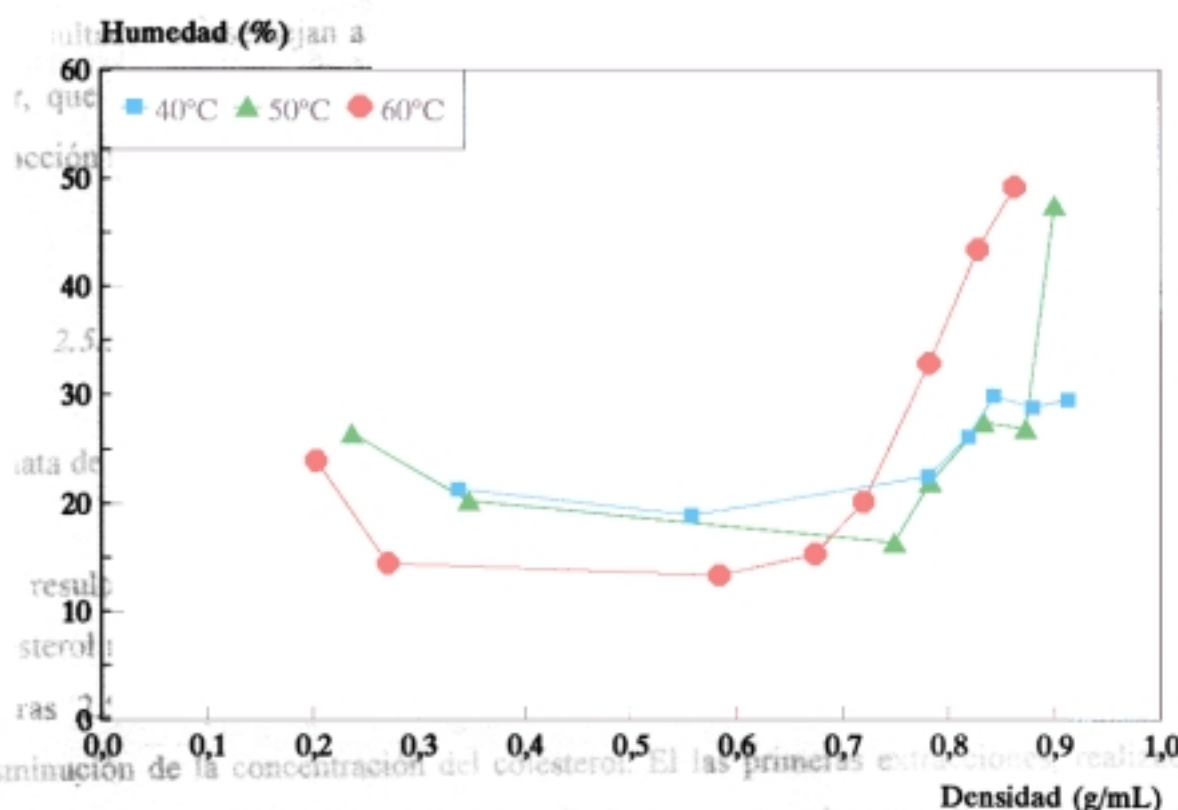


Figura 2.5.4. Efecto de la densidad de la extracción sobre el contenido de agua de la nata

en parte debido a que se extrae junto con el  $\text{CO}_2$  y en parte porque la fracción grasa de la nata es mucho más soluble en el fluido supercrítico, influyendo en el porcentaje de agua. Los resultados de las medidas quedan reflejados en la gráfica 2.5.4.

La extracción por arrastre está confirmada porque a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  la disminución de la humedad es mayor que a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  y  $50\text{ }^\circ\text{C}$ .

A las densidades de 0,20 y 0,24 g/mL existe una extracción importante de agua que hace que los porcentajes en el residuo sean inferiores a los de la nata original (28%). Esta humedad se mantiene hasta densidades cercanas a 0,60 g/mL o descende levemente, este hecho puede explicarse porque, si bien hay una extracción de agua, hay una pequeña pero progresiva disminución del contenido de grasa en la nata. Densidades superiores producen un rápido aumento de la solubilidad de la grasa, y la nata con tan bajo contenido en grasa da como resultado un aumento de la humedad hasta un 50%.

Los resultados se asemejan a los obtenidos por Snyder y col. (1984) a partir de soja, es decir, que la humedad de los residuos va aumentando con la presión. La causa es la extracción mayor de compuestos lipídicos por ser éstos más solubles en  $\text{CO}_2$  supercrítico.

#### *2.5.5- Efecto sobre la extracción de colesterol*

La nata de partida tenía un contenido de colesterol de 2,20 mg/g.

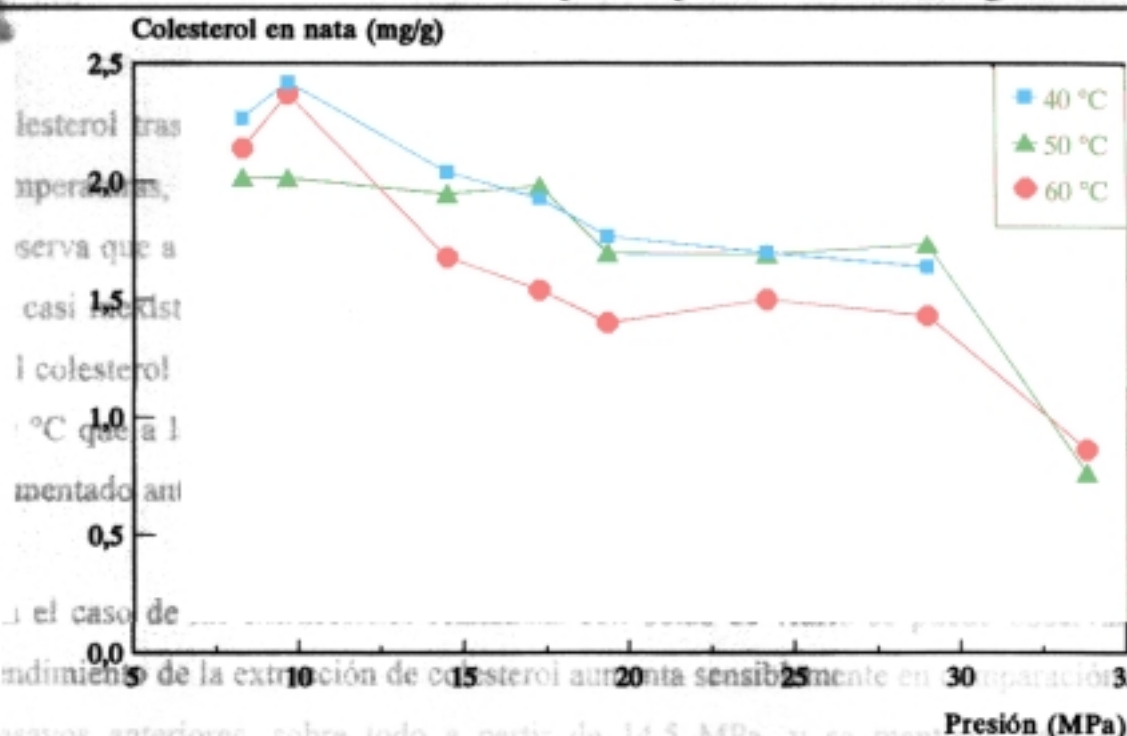
Los resultados de las extracciones con  $\text{CO}_2$  supercrítico sobre la concentración de colesterol resultante en las natas tratadas quedan reflejados en las tablas 2.5.5 a y b. Las figuras 2.5.5 a y b representan el efecto de la presión y la temperatura sobre la disminución de la concentración del colesterol. En las primeras extracciones, realizadas sin bolas de vidrio se obtuvo un bajo rendimiento en general para todas las presiones y temperaturas estudiadas, con excepción de las realizadas a 33,8 MPa. El contenido en

Tabla 2.5.5a. Concentración de colesterol en la nata sin bolas de vidrio tras el tratamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico.

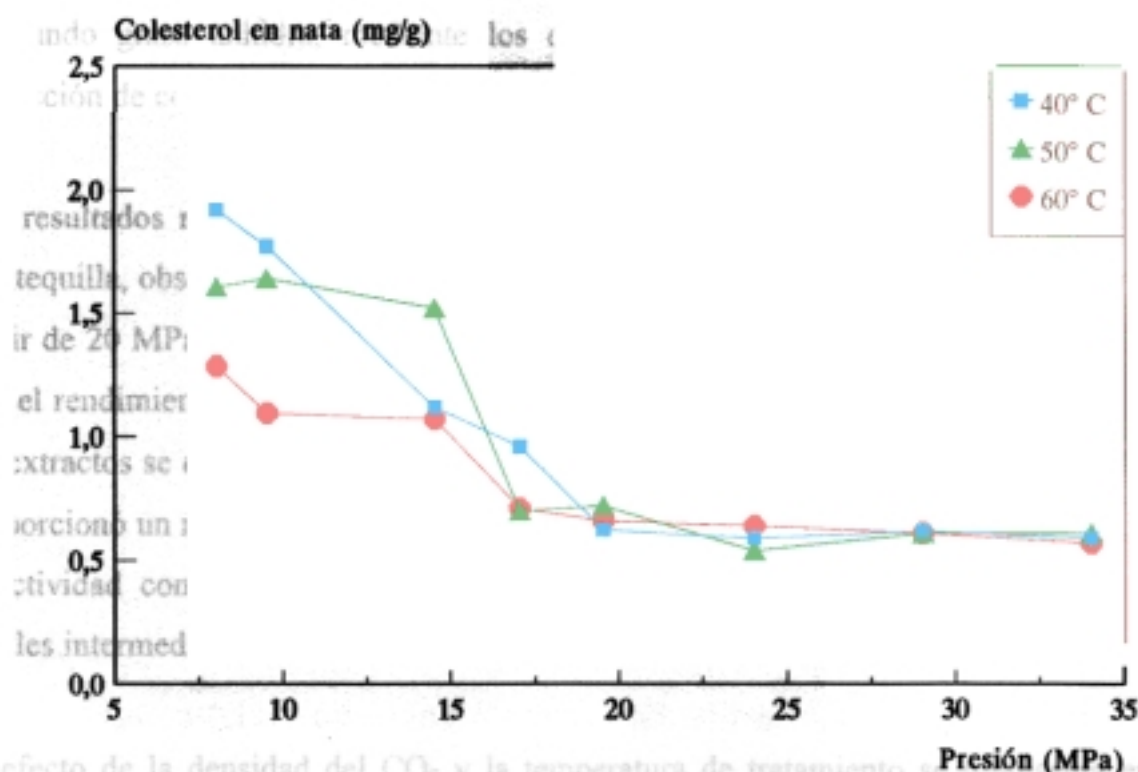
Presión (MPa)	Concentración de colesterol (mg/g)		
	40 °C	50 °C	60 °C
8,3	2,27	2,02	2,14
9,7	2,42	2,01	2,37
14,5	2,04	1,95	1,68
17,2	1,93	1,98	1,54
19,3	1,77	1,70	1,40
24,1	1,70	1,69	1,50
29,0	1,64	1,74	1,43
33,8	-	0,76	0,86

Tabla 2.5.5b. Concentración de colesterol en la nata con bolas de vidrio tras el tratamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico.

Presión (MPa)	Concentración de colesterol (mg/g)		
	40 °C	50 °C	60 °C
8,3	1,92	1,61	1,29
9,7	1,77	1,64	1,10
14,5	1,12	1,52	1,07
17,2	0,96	0,70	0,71
19,3	0,63	0,72	0,66
24,1	0,59	0,54	0,64
29,0	0,62	0,61	0,61
33,8	0,59	0,61	0,57



**Figura 2.5.5a. Efecto de la presión y temperatura sobre la concentración de colesterol en la nata tras las extracciones sin bolas de vidrio**



**Figura 2.5.5b. Efecto de la presión y temperatura en la concentración de colesterol en la nata tras la extracción con bolas de vidrio**

colesterol tras el tratamiento a 9,7 MPa es superior o igual al de 8,3 MPa en las tres temperaturas, pudiéndose explicar por haber una menor cantidad de agua en la nata. Se observa que a presiones entre 14,5 y 29,0 MPa el aumento en la extracción de colesterol es casi inexistente, pero a 33,9 MPa hay un brusco aumento en el que se extrae el 65% del colesterol de la nata de partida. La solubilidad del colesterol es generalmente mayor a 60 °C que a las otras temperaturas por el efecto del aumento de la presión de vapor ya comentado anteriormente.

En el caso de las extracciones realizadas con bolas de vidrio se puede observar que el rendimiento de la extracción de colesterol aumenta sensiblemente en comparación con los ensayos anteriores, sobre todo a partir de 14,5 MPa, y se mantiene para presiones mayores. Estos resultados muestran claramente la necesidad de dispersar la nata en un soporte sólido para aumentar el contacto entre las fases y la transferencia de masa por el aumento de la dispersión del CO<sub>2</sub> en la muestra a tratar. El rendimiento llega a ser de un 75%. Estos resultados mejoran otros obtenidos anteriormente por Yu y col. (1992) utilizando grasa anhidra, mediante los que consiguió en las condiciones de mayor extracción de colesterol (31 MPa y 40 °C) un rendimiento del 20%.

Los resultados mejoran los obtenidos por Shishikura y col. (1986), ya que, utilizando mantequilla, observaron una gran disminución del rendimiento en la extracción de grasa a partir de 20 MPa y 40 °C, y un enriquecimiento en triglicéridos de cadena larga, con lo que el rendimiento en la extracción de colesterol fue muy bajo a partir de esta presión y los extractos se empobrecieron en colesterol. El estudio llevado a cabo con grasa anhidra proporcionó un mejor rendimiento en la extracción de grasa y de colesterol, con lo que la selectividad conseguida fue baja. En el presente trabajo se obtuvieron residuos con niveles intermedios de grasa y de colesterol.

El efecto de la densidad del CO<sub>2</sub> y la temperatura de tratamiento se representa en las figuras 2.5.5 c y d (sin y con presencia de bolas de vidrio respectivamente). En ambos casos se aprecia que los tratamientos a 60 °C son siempre los que producen una mayor

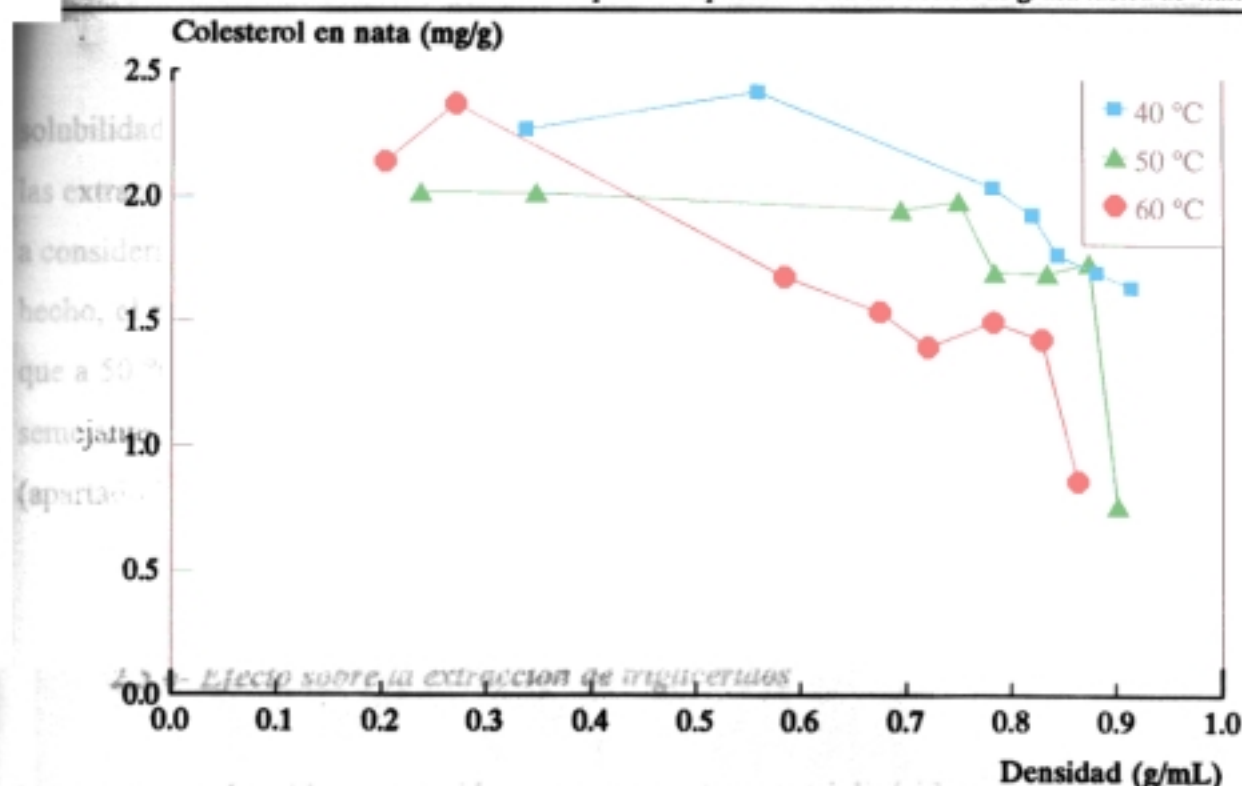


Figura 2.5.5c. Efecto de la densidad en la concentración de colesterol en nata tras la extracción sin bolas de vidrio

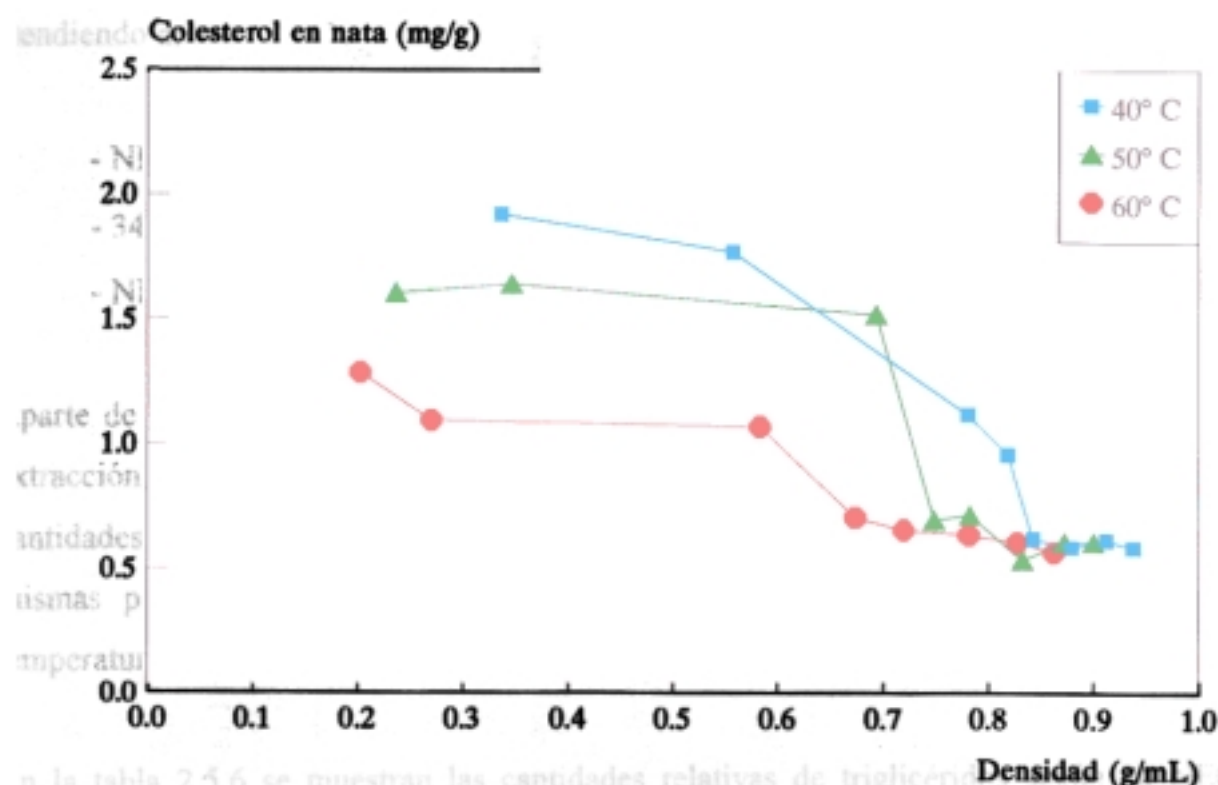


Figura 2.5.5d. Efecto de la densidad en la concentración de colesterol en la nata tras la extracción con bolas de vidrio



solubilidad del colesterol en el fluido supercrítico (excepto a 0,20 y 0,27 g/mL y 60 °C en las extracciones sin bolas). De esta forma se destaca que, si bien la densidad es un factor a considerar, la temperatura es un factor determinante para la extracción de colesterol. De hecho, el mayor rendimiento se alcanza ya a 60 °C con una densidad (0,67 g/mL) menor que a 50 °C (0,75 g/mL), y aún menor que a 40 °C (0,82 g/mL). Este comportamiento es semejante al que se produce en el caso de la extracción de la fracción grasa total (apartado 2.5.3).

#### *2.5.6- Efecto sobre la extracción de triglicéridos*

Los extractos obtenidos se consideraron compuestos por triglicéridos casi en su totalidad. De esta forma se puede considerar la variación de la cantidad de extracto obtenido como la variación en la extracción de triglicéridos. Tras los análisis por HPLC de los triglicéridos no extraídos, se calcularon las cantidades relativas de triglicéridos atendiendo a:

- $NEC \leq 34$  (triglicéridos de cadena corta e insaturados de cadena media o larga),
- $34 < NEC \leq 40$  (triglicéridos de cadena media e insaturados de cadena larga),
- $NEC > 40$  (triglicéridos de cadena larga, sean saturados o insaturados).

Aparte de las diferencias ya discutidas en el apartado 2.5.3 sobre el rendimiento de la extracción entre las realizadas sin o con bolas no se encontraron otras diferencias. Las cantidades relativas de triglicéridos de distinto NEC y grado de saturación fueron las mismas para las extracciones sin y con bolas para cada condición de presión y temperatura.

En la tabla 2.5.6 se muestran las cantidades relativas de triglicéridos según su NEC, temperatura y presión. Se observa que para las tres temperaturas de estudio los extractos

Tabla 2.5.6. Triglicéridos<sup>1</sup> no extraídos por el tratamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico.

Presión (MPa)	NEC ≤ 34			34 < NEC ≤ 40			NEC > 40		
	40 °C	50 °C	60 °C	40 °C	50 °C	60 °C	40 °C	50 °C	60 °C
8,3	26,28	26,27	27,83	39,08	38,88	38,25	34,64	34,85	33,92
9,7	21,83	25,33	23,76	39,40	38,77	38,00	38,77	35,90	38,24
14,5	17,70	25,11	20,61	36,17	38,62	39,65	46,13	36,27	39,73
17,2	16,07	20,24	14,32	31,93	36,26	37,22	52,00	43,50	48,48
19,3	21,08	13,05	11,75	35,74	29,39	35,14	43,19	57,55	53,11
24,1	22,92	22,57	5,98	38,59	37,79	20,83	38,48	39,65	73,19
29,0	23,40	23,51	15,61	38,69	37,82	33,24	37,91	38,67	51,15
33,8	25,76	-	22,29	38,19	-	36,28	36,04	-	41,43

<sup>1</sup> Triglicéridos en % del total de triglicéridos de cada extracción. Los porcentajes en la fracción triglicérica de partida son 24,53% NEC ≤ 34, 38,93% 34 < NEC ≤ 40, 36,54% NEC > 40.

de presiones menor y mayor (8,3 y 33,4 MPa) tienen una composición similar a la fracción triglicérica de la nata de partida (24,53%  $NEC \leq 34$ ; 38,93%  $34 < NEC \leq 40$ ;  $NEC > 40$ ) con la única diferencia de la masa de extracto total obtenida. Únicamente a presiones intermedias se consigue mejorar la selectividad de la extracción, al aumentar la extracción de triglicéridos de  $NEC \leq 40$  y disminuir la de los de  $NEC > 40$ . La máxima selectividad de la extracción se consigue a 17,2, 19,3 y 24,1 MPa a las temperaturas de 40, 50 y 60 °C respectivamente, mejorándose la selectividad conseguida al aumentar la temperatura. Estos resultados nos indican claramente la influencia positiva de la temperatura en el aumento de la solubilidad de triglicéridos con menor punto de fusión (insaturados y de cadena corta y media) por aumento de su presión de vapor; si bien, con las presiones más elevadas mejora la extracción de los triglicéridos de mayor punto de fusión. Las figuras 2.5.6a y b representan respectivamente el cromatograma de triglicéridos de la nata de partida o control y tras el tratamiento a 24,1 MPa y 60 °C.

En la gráfica 2.5.6c puede verse la influencia de la densidad en la selectividad de la extracción de los distintos tipos de triglicéridos. Existe una densidad (0,8 g/mL) alrededor de la cual se alcanza un máximo en la selectividad de la extracción de triglicéridos con  $NEC \leq 40$ , independientemente de la temperatura de tratamiento, aunque ésta contribuye a mejorar esta selectividad según se ha comentado anteriormente. A densidades menores o mayores se pierde la selectividad por aumento de la extracción de triglicéridos con  $NEC > 40$ .

Estos resultados difieren en parte con los obtenidos en investigaciones anteriores de grasa láctea realizada por otros autores. Chen y col. (1992a), estudiando la grasa láctea anhidra, obtienen resultados semejantes en lo referido a la variación de la solubilidad de los triglicéridos totales respecto a la presión y temperatura, observando que la extracción mejoraba al aumentar la presión y disminuir la temperatura, excepto a presiones altas, en las que la temperatura producía poca influencia, explicándose este comportamiento por el balance entre el efecto de la densidad del CO<sub>2</sub> y el efecto de la presión de vapor de los

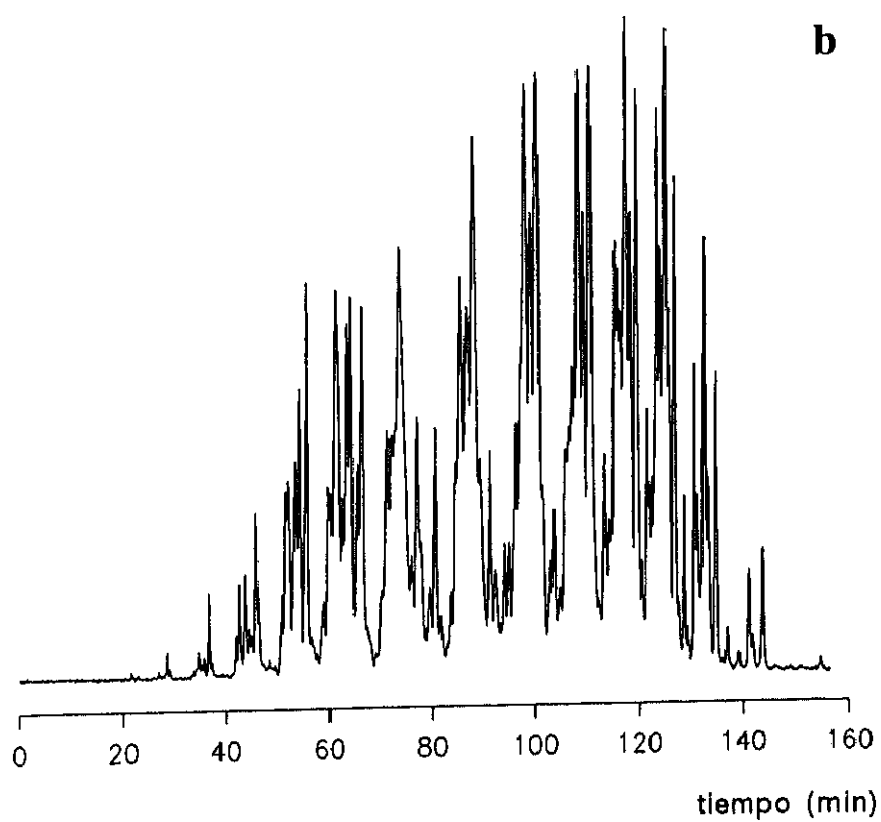
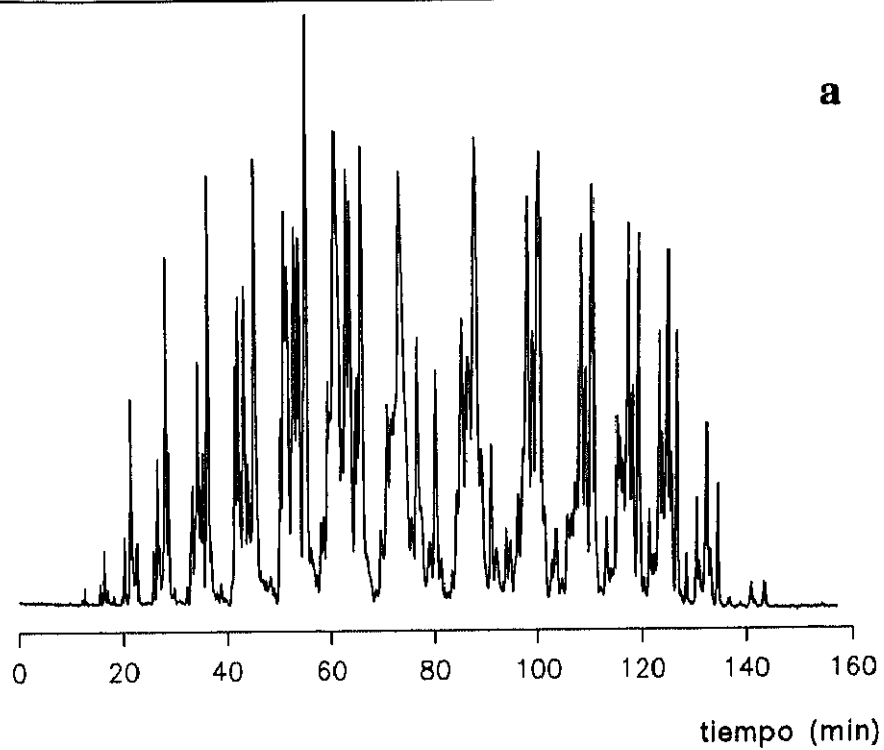


Figura 2.5.6a: triglicéridos de la nata control, b: triglicéridos de nata tratada a 24,1 MPa y 60 °C

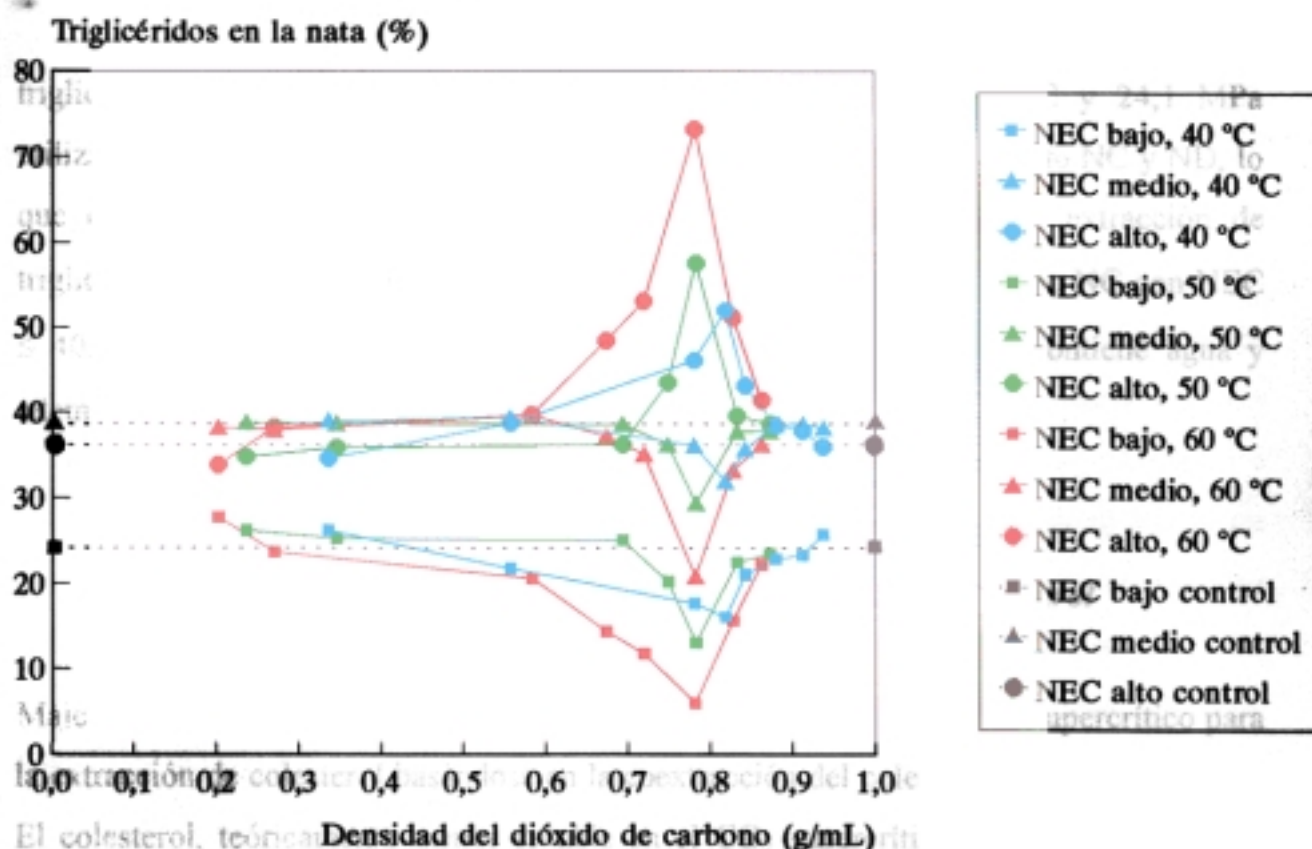


Figura 2.5.6c. Efecto de la densidad y la temperatura en la extracción de triglicéridos

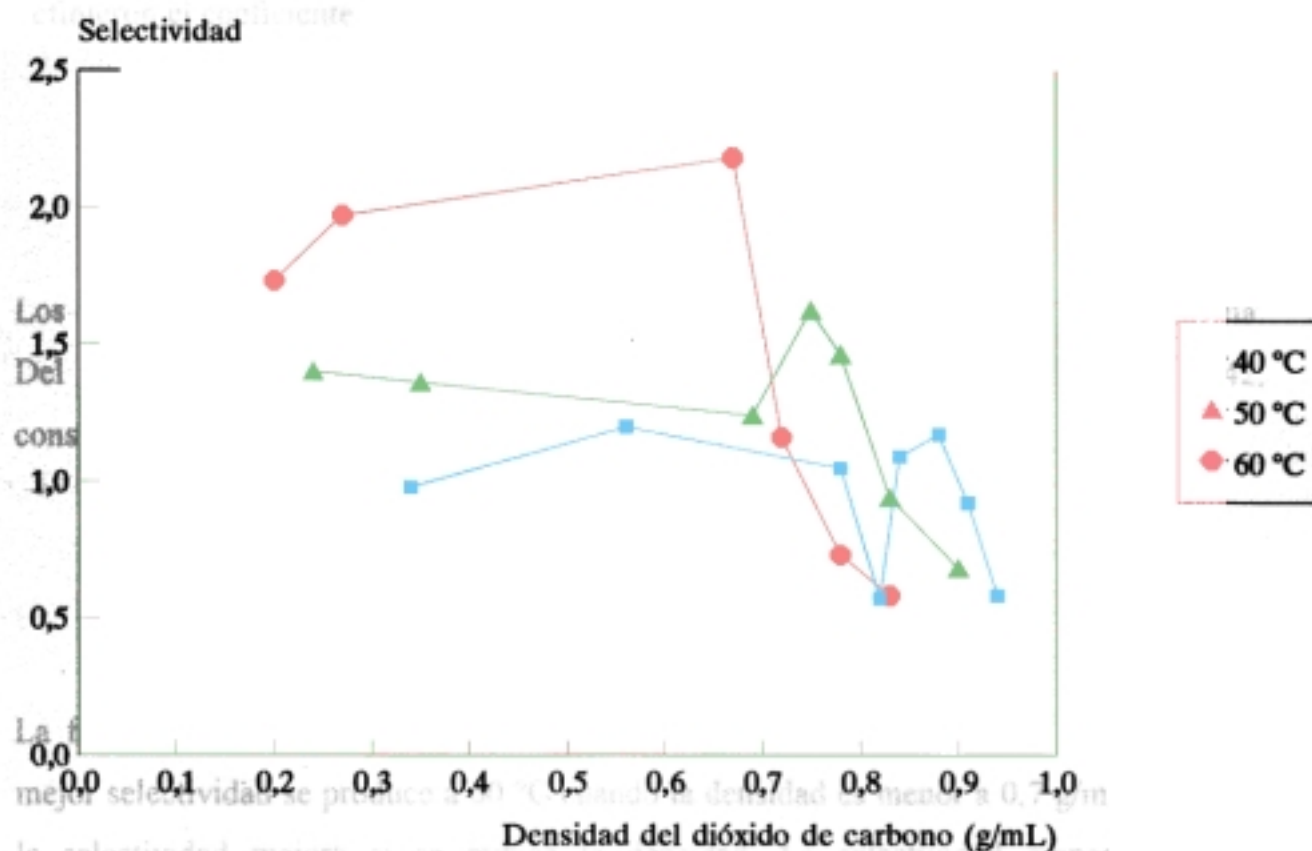


Figura 2.5.7. Selectividad en la extracción de colesterol

triglicéridos. Shukla y col. (1994) realizaron un tratamiento a 40 °C y 24,1 MPa utilizando grasa anhidra, obteniendo un extracto rico en triglicéridos de alto NC y ND, lo que difiere con los resultados de esta investigación (aumento de la extracción de triglicéridos de  $NEC \leq 40$ ), si bien existen triglicéridos insaturados de alto NC con  $NEC \leq 40$ . Las diferencias encontradas pueden ser debidas a que la nata contiene agua y además es una emulsión de signo O/A.

### 2.5.7- Selectividad del $CO_2$ supercrítico en la extracción de colesterol

Majewski y col. (1994) definieron el coeficiente de selectividad del  $CO_2$  supercrítico para la extracción de colesterol basándose en la coextracción del colesterol y los triglicéridos. El colesterol, teóricamente menos soluble en el  $CO_2$  supercrítico que los triglicéridos, posee una alta afinidad por los triglicéridos de cadena corta y media. Refiriéndose a la concentración de colesterol y ácidos grasos en los sustratos antes y tras su tratamiento, definieron el coeficiente de selectividad de la siguiente manera:

$$Selectividad = \frac{\text{relacion } \underline{\text{colesterol}} / \underline{\text{ácidos grasos}} \text{ } \underline{NC < 14} \text{ en } \underline{\text{control}}}{\text{relacion } \underline{\text{colesterol}} / \underline{\text{ácidos grasos}} \text{ } \underline{NC < 14} \text{ en } \underline{\text{residuo}}} \quad (2.43)$$

Los ácidos grasos de menos de 14 átomos de carbono son los de cadena corta y media. Del mismo modo se pueden realizar los cálculos con triglicéridos de  $NEC < 42$ , constituyéndose la ecuación de la manera indicada:

$$Selectividad = \frac{\text{relacion } \underline{\text{colesterol}} / \underline{\text{trigliceridos}} \text{ } \underline{NEC < 42} \text{ en } \underline{\text{control}}}{\text{relacion } \underline{\text{colesterol}} / \underline{\text{trigliceridos}} \text{ } \underline{NEC < 42} \text{ en } \underline{\text{residuo}}} \quad (2.44)$$

La figura 2.5.7 representa los resultados obtenidos del cálculo de la selectividad. La mejor selectividad se produce a 60 °C cuando la densidad es menor a 0,7 g/mL, es decir, la selectividad mejora si se reduce la densidad. La selectividad empeora con la

disminución de temperatura y los máximos se consiguen a densidades de 0,8 y 0,9 g/mL para 50 y 40 °C respectivamente. Los resultados coinciden con los de Majewski y col. (1994) sobre los estudios con grasa láctea anhidra en que la presión adecuada para conseguir la mejor selectividad a 60 °C está entre 15 y 17,5 MPa. Los resultados difieren en que en su estudio la selectividad es mejor a 50 que a 60 °C, pero señalan que no es cierto que estos resultados puedan ser fiables totalmente. Los resultados también concuerdan con los de Yu y col. (1992), donde la mayor selectividad se consiguió a presiones menores de 15 MPa cuando la temperatura fue de 60 °C (la densidad era menor de 0,6 g/mL); la disminución de temperatura hasta los 40 °C produjo que la selectividad alcanzada fuera menor que a 60 °C, si bien el máximo también se alcanzó en el mismo intervalo de presiones (la densidad fue menor de 0,8 g/mL), al contrario que lo obtenido por Majewski y col. (1994) en el mismo sustrato.

## ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE $^{13}\text{C}$ -RMN

### 2.6- MATERIALES Y MÉTODOS

#### *2.6.1- Preparación de la muestra y extracción de grasa de nata*

La nata, de leche cruda de oveja procedente del Complejo Agropecuario Comunidad de Madrid en Aranjuez, se obtuvo del mismo modo a la del apartado 2.2.1.

Las extracciones se realizaron en modo dinámico con un volumen de  $\text{CO}_2$  de 360 L en las siguientes condiciones:

presiones de 13,8, 17,2, 20,7 y 24,1 MPa,  
temperaturas de 40 y 60 °C.

#### *2.6.2- Análisis de los extractos mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear del $^{13}\text{C}$*

Se pesaron 100 mg de los extractos obtenidos y se disolvieron en cloroformo para su filtración en papel 1PS (Whatman). Posteriormente se evaporó el disolvente mediante una corriente de  $\text{N}_2$  y el extracto seco se redisolvió en cloroformo deuterado para su análisis.

El equipo utilizado fue un Varian XL-300 de 75 MHz en  $^{13}\text{C}$ . Los valores de los desplazamientos químicos se expresaron en unidades  $\delta$  (ppm). Los espectros se realizaron por triplicado.



## 2.7- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.7.1- Análisis de los extractos mediante resonancia magnética nuclear del $^{13}\text{C}$ .

El espectro obtenido a partir de la grasa láctea antes de los tratamientos se encuentra representado en la figura 2.7.1a. Las figuras 2.7.1b, c y d son ampliaciones de las regiones carbonílica, olefinica y saturada respectivamente. Se observa la baja sensibilidad de la técnica espectroscópica ya que solamente es posible la detección de los compuestos mayoritarios, en este caso los triglicéridos. No fue posible la detección de colesterol.

Sin embargo, pudo realizarse un análisis de distribución posicional de los ácidos grasos que componen los triglicéridos, detectándose ácidos grasos de cadena corta unidos únicamente en la posición  $\alpha$  (o  $\alpha'$ ) En la tabla 2.7.1 se detallan los desplazamientos químicos correspondientes a cada señal y el grupo funcional que se ha asignado.

**Tabla 2.7.1.** Desplazamientos químicos y grupos funcionales asignados tras el análisis por  $^{13}\text{C}$ -RMN de los triglicéridos de la grasa láctea de oveja.

$\delta$ (ppm)	Carbono correspondiente
173,220	C1 $\alpha$ a.g. * saturados
173,185	C1 $\alpha$ a.g. insaturados
173,018	C1 $\alpha$ (Bu)
172,820	C1 $\beta$ a.g. saturados
172,784	C1 $\beta$ a.g. insaturados
131,959	HC= (Ln)
130,315	HC= (V)
130,220	HC= (L, Ln)
130,025	HC= (O, L)
129,715	HC= (O)
128,312	HC= (Ln)

tabla 2.7.1	(continuación)
128,280	HC= (Ln)
128,137	HC= (L)
127,954	HC= (L)
127,780	HC= (Ln)
127,181	HC= (Ln)
68,972	HC-O- ( $\beta$ )
62,129	H <sub>2</sub> C-O- ( $\alpha$ )
35,943	C2 $\alpha$ (Bu)
34,242	C2 $\beta$
34,073	C2 $\alpha$
32,618	CH <sub>2</sub> -CH= <i>trans</i>
32,592	CH <sub>2</sub> -CH= <i>trans</i>
31,956	$\omega$ 3
31,814	$\omega$ 3 n-7 (V)
31,684	$\omega$ 3 (Cl)
31,553	$\omega$ 3 <i>cis</i> n-6
31,280	$\omega$ 3 (Co)
29,8-28,9	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -
27,254	CH <sub>2</sub> -CH= <i>cis</i>
27,202	CH <sub>2</sub> -CH= <i>cis</i>
25,668	=CH-CH <sub>2</sub> -HC= (C11 de L y Ln)
25,568	=CH-CH <sub>2</sub> -HC= (C14 de Ln)
24,936	C3 $\beta$
24,903	C3 $\alpha$
24,565	C3 (Co)
22,775	$\omega$ 2 (L)
22,700	$\omega$ 2
22,305	$\omega$ 2 (Co)
20,600	$\omega$ 2 (Ln)

tabla 2.7.1	(continuación)
18,369	$\omega 2$ ó C3 (Bu)
14,252	$\omega 1$ (Ln)
14,093	$\omega 1$
14,000	$\omega 1$ (L)
13,862	$\omega 1$ (Co)
13,602	$\omega 1$ (Bu)

\* ácidos grasos

Los datos obtenidos permiten la cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta de forma separada del resto de ácidos grasos; esto mismo es posible con los ácidos grasos poliinsaturados. También es posible cuantificar los ácidos grasos *trans* separadamente de los *cis*.

Se calculó un número de carbonos medio a partir de las integrales de los extractos analizados de la forma siguiente:

$$NC = \left( \frac{CH_2 + CH_3 + CH=}{COH} + 1 \right) \times 3 \quad (2.45)$$

La relación de carbonos insaturados frente a saturados:

$$i/s = \frac{CH=}{CH_2 + CH_3} \quad (2.46)$$

También se calcularon los porcentajes molares de:

- ácido butírico, a partir de  $\omega 2$  (C3),
- ácido caproico, a partir de  $\omega 3$ ,

- ácido caprílico, a partir de  $\omega 3$ ,
- carbonos *trans* en el total de insaturados a partir de los carbonos alílicos,
- ácidos linoleico y linolénico en el total de ácidos grasos insaturados, expresado como ácido linoleico.

Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 2.7.1 (e - k). Se observa que, a temperatura constante, conforme aumenta la presión hay un aumento en el número de carbonos medio del extracto por aumento progresivo de la densidad (figura 2.7.1e), lo que se traduce en un aumento de la extracción de triglicéridos de alto peso molecular. La disminución de la temperatura produce una mayor extracción de estos triglicéridos por aumento de la densidad a una presión constante a partir de 17,2 MPa. Por el contrario, a la menor presión del estudio (13,8 MPa), el aumento de la temperatura produce un aumento de la extracción de triglicéridos de mayor peso molecular; esto se debe a que el aumento de la temperatura conduce a un evidente favorecimiento de la extracción por arrastre de aquellos triglicéridos de mayor punto de fusión, estos triglicéridos son más difíciles de extraer si la temperatura es baja (40 °C), ya que las condiciones de baja presión del tratamiento producen una densidad baja, con poca capacidad para extraer los triglicéridos de mayor NC únicamente por efecto de la solubilización en el fluido. A las presiones intermedias, 17,2 y 20,7 MPa, la mayor densidad a 40 °C que a 60 °C es ya suficiente para que se extraigan los triglicéridos de mayor peso molecular en mayores cantidades, ya que a estas presiones pequeñas variaciones de presión conducen a grandes variaciones de densidad. A 24,1 MPa, la presión es tan alta que no existen apenas diferencias de densidad entre 40 y 60 °C, el número medio de carbonos se iguala en las dos temperaturas por verse favorecida la extracción de los triglicéridos de mayor NC con el aumento de su presión de vapor a 60 °C.

Se observa en la figura 2.7.1f que el aumento de densidad al aumentar la presión y a temperatura constante produce un aumento de la extracción de los triglicéridos insaturados, excepto a la presión de 24,1 MPa, en concordancia con el aumento de los triglicéridos de mayor NC (figura 2.7.1e) porque la mayor parte de los triglicéridos

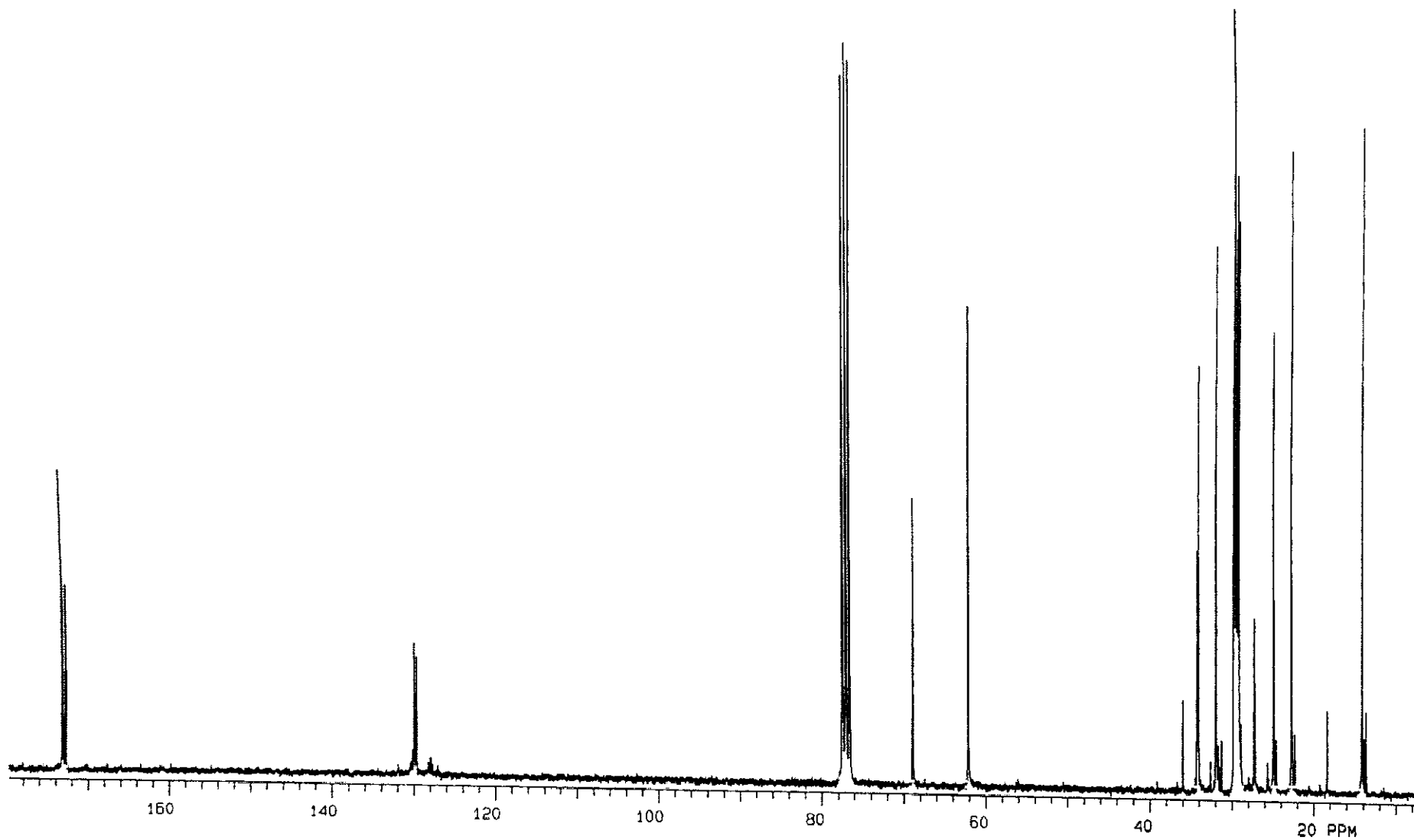


Figura 2.7.1a. Espectro de la grasa láctea de oveja por  $^{13}\text{C}$ -RMN

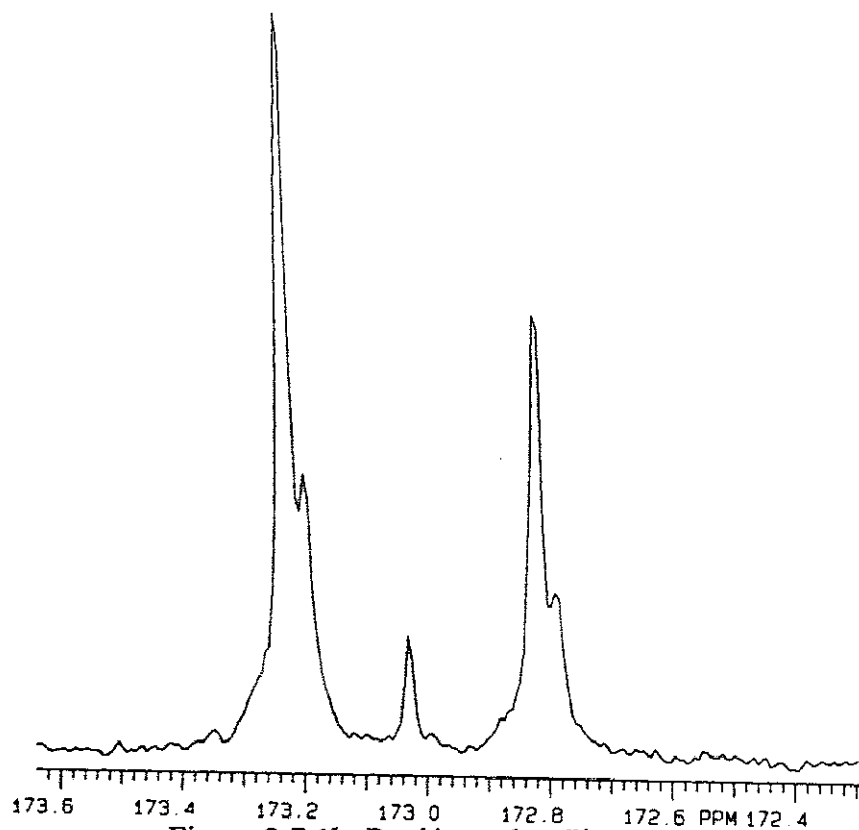


Figura 2.7.1b. Región carbonílica

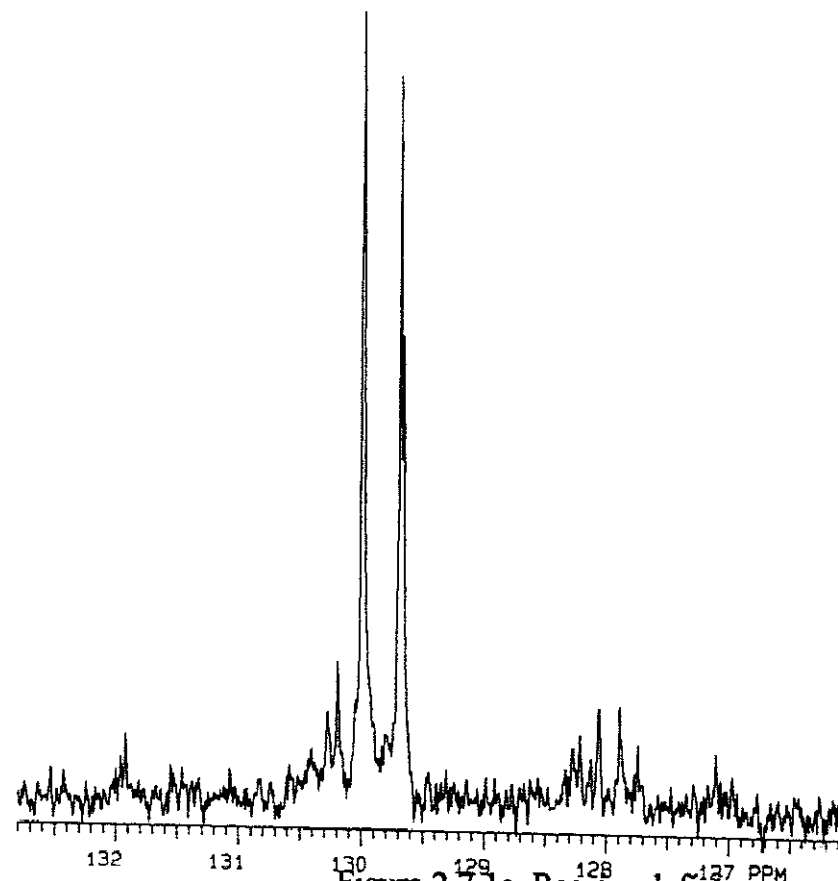


Figura 2.7.1c. Región olefínica

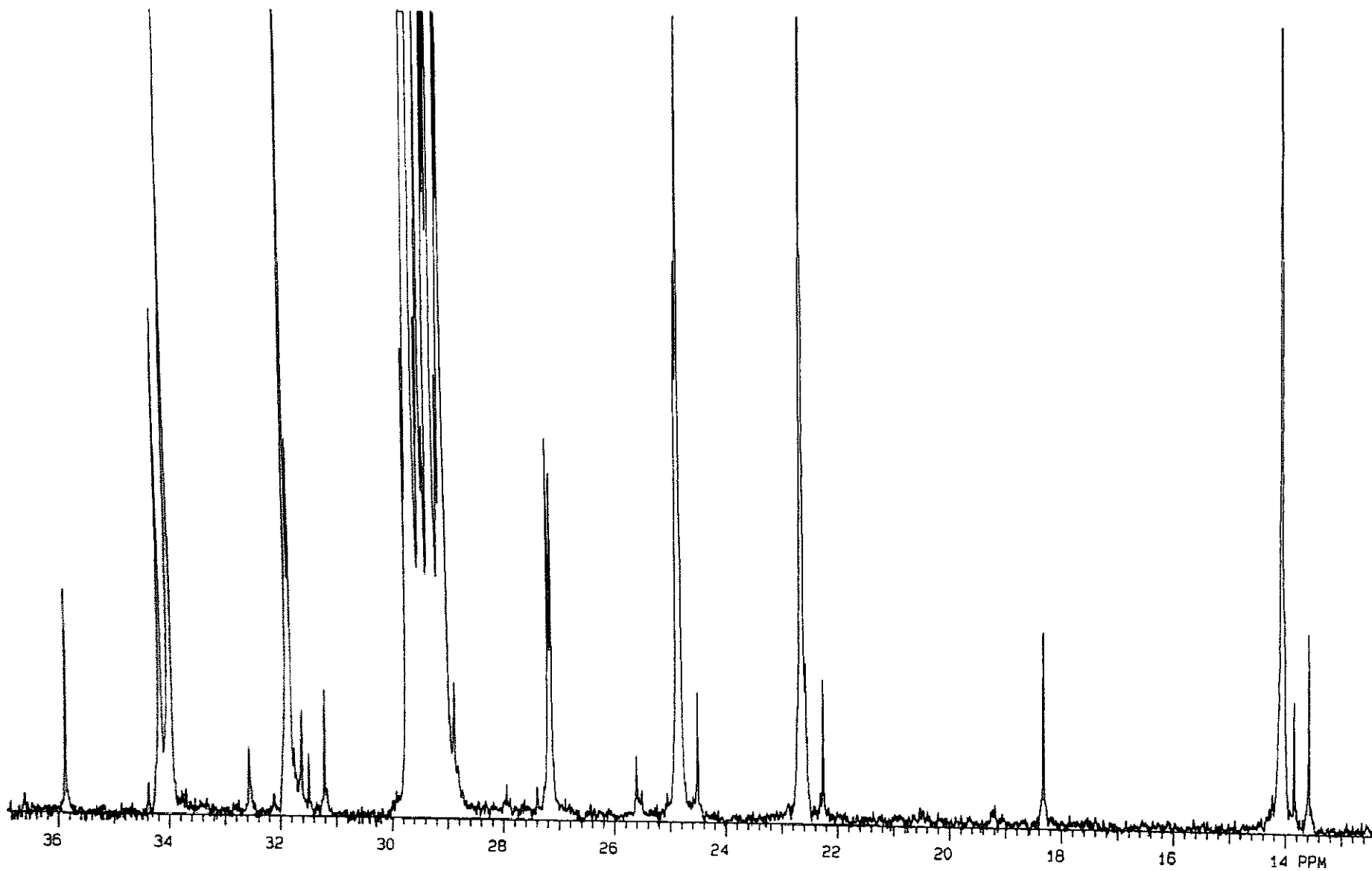


Figura 2.7.1d. Región metílica y metilénica

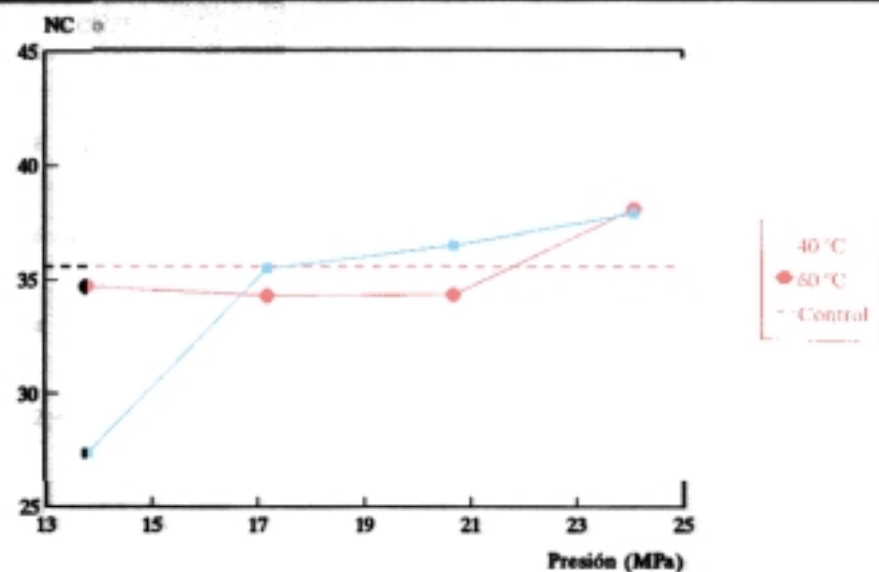


Figura 2.7.1e. Número de carbonos medio de los triglicéridos de los extractos

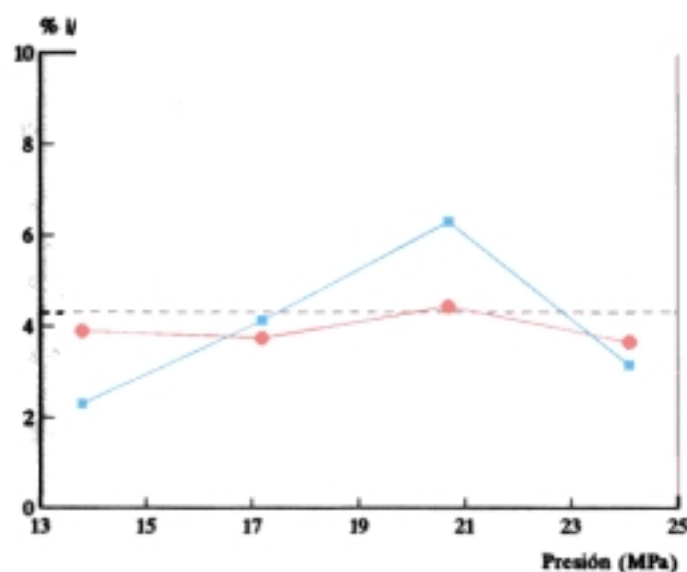


Figura 2.7.1f. Porcentaje molar carbonos insaturados/saturados en los extractos

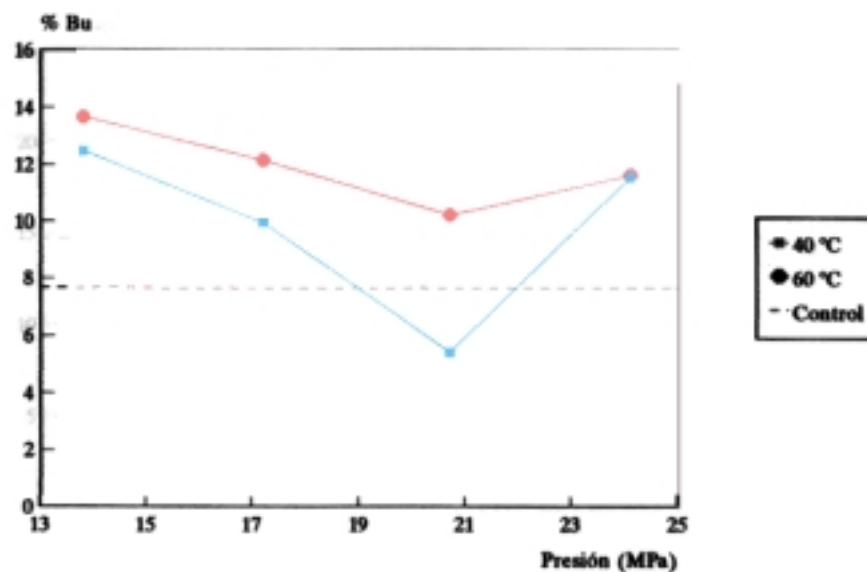


Figura 2.7.1g. Porcentaje molar de ácido butírico en los extractos (C3)



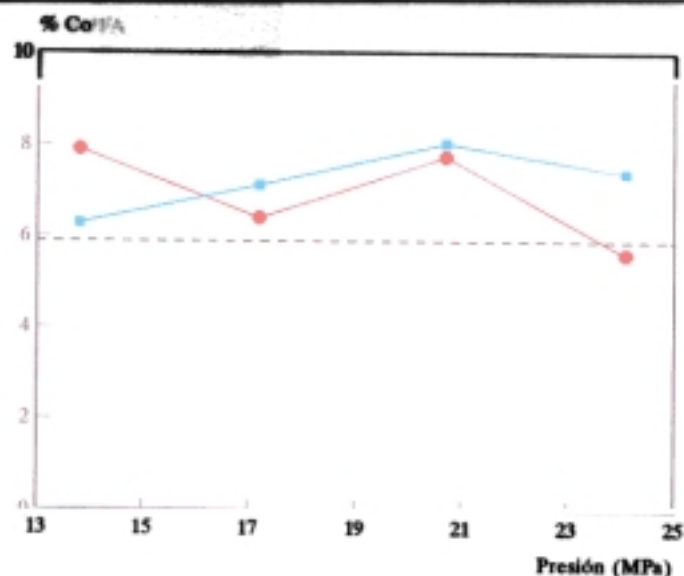


Figura 2.7.1h. Porcentaje molar de ácido caproico en los extractos (omega 3)

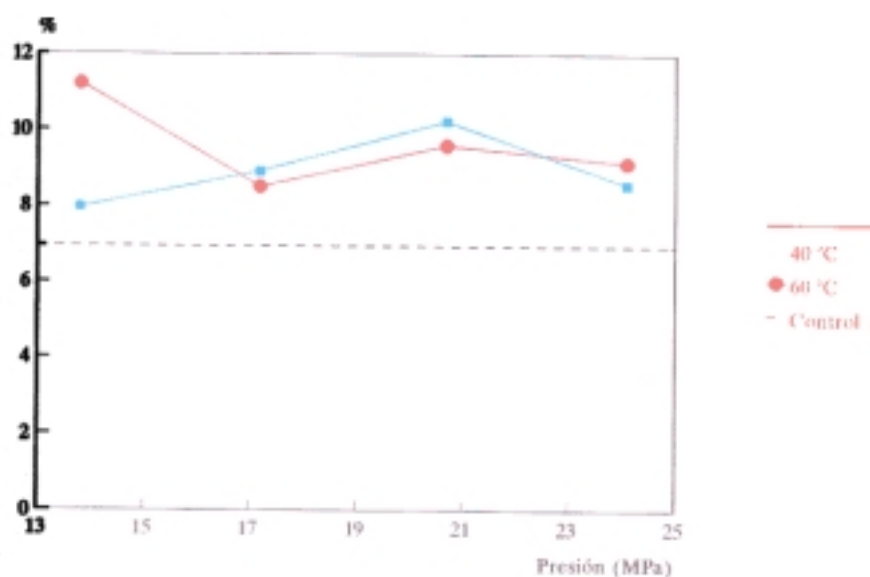


Figura 2.7.1i. Porcentaje molar de ácido caprílico en los extractos (omega 3)

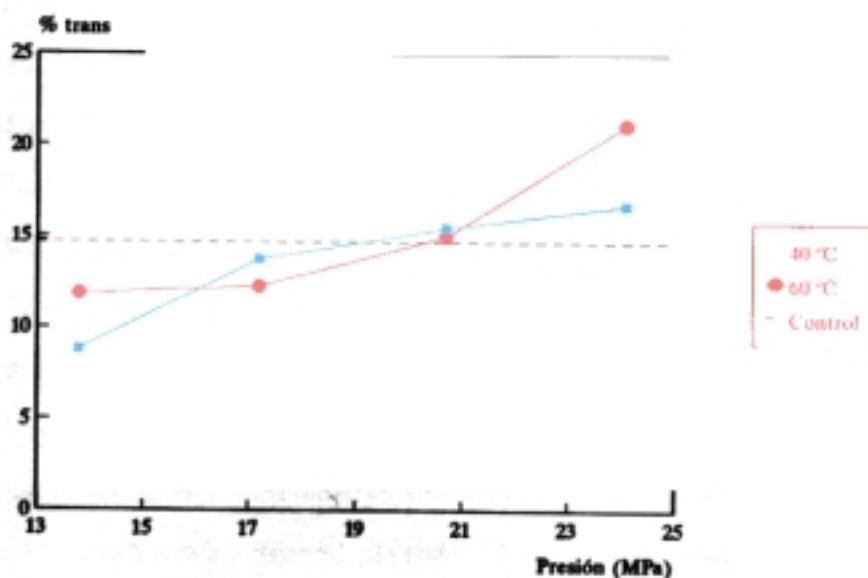


Figura 2.7.1j. Porcentaje de insaturaciones trans en el total de insaturaciones en los extractos

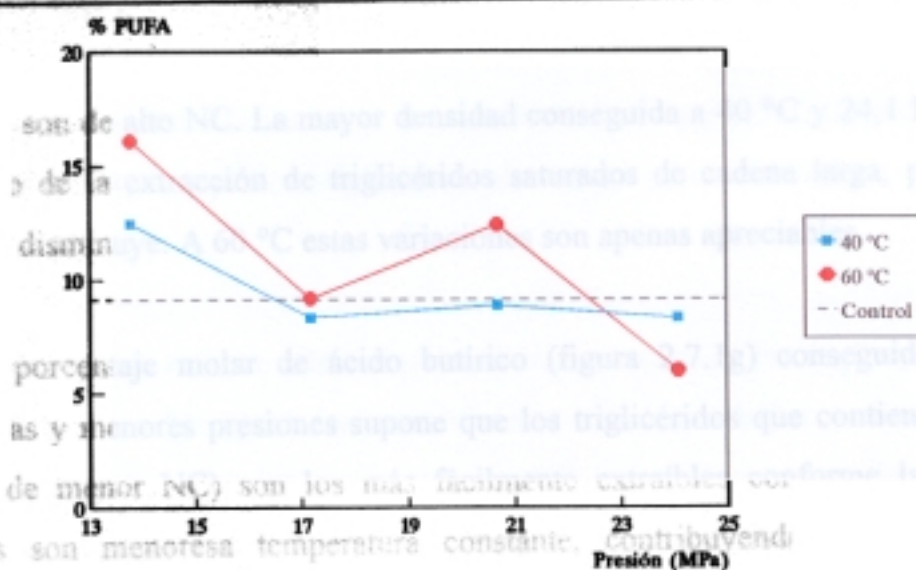


Figura 2.7.1k. Porcentaje molar de PUFA en el total de UFA en los extractos

insaturados son de alto NC. La mayor densidad conseguida a 40 °C y 24,1 MPa produce un aumento de la extracción de triglicéridos saturados de cadena larga, por lo que la relación i/s disminuye. A 60 °C estas variaciones son apenas apreciables.

El mayor porcentaje molar de ácido butírico (figura 2.7.1g) conseguido a mayores temperaturas y menores presiones supone que los triglicéridos que contienen éste ácido graso (el de menor NC) son los más fácilmente extraíbles conforme las densidades empleadas son menores a temperatura constante, contribuyendo, además, de modo importante el efecto del aumento de su presión de vapor al utilizar temperaturas mayores (60 °C). A las dos presiones intermedias estudiadas se produce un descenso en la extracción de butírico por aumento de la extracción de triglicéridos que contienen ácidos caproico y caprílico, que se recupera en parte a 24,1 MPa. Los ácidos caproico y caprílico se extraen en mayor proporción en condiciones intermedias de presión (17,2 y 20,7 MPa) a 40 °C (figuras 2.7.1 h e i) contrariamente a la extracción de butírico, condiciones en las que hay una mayor extracción de triglicéridos de cadena media. El efecto producido a 60 °C y 13,8 MPa es el mismo que ocurre en la variación del NC medio.

En general se observa una mayor solubilidad de triglicéridos con insaturaciones *cis* que *trans* a presiones bajas, hecho que produce que los extractos tengan una composición enriquecida en ácidos *cis* respecto al control. Este resultado puede explicarse ya que los enlaces *cis* producen menores puntos de fusión que los *trans* en las moléculas, favoreciendo su extracción. El aumento de la densidad al aumentar la presión produce el efecto contrario, apareciendo extractos ricos en ácidos *trans*-insaturados respecto al control. El efecto del aumento de la temperatura en el aumento de la presión de vapor de aquellos triglicéridos menos volátiles, los que poseen enlaces *trans*, es evidenciable a presiones de 13,8 MPa, donde la densidad tan baja es poco eficaz para una buena extracción, y a 24,1 MPa, donde la densidad a 40 y 60 °C muestra apenas diferencias.

Los ácidos grasos poliinsaturados forman parte de triglicéridos de bajo NEC y se extraen de forma más selectiva a las menores presiones y 60 °C en comparación con los ácidos

grasos monoinsaturados, debido a que las menores condiciones de densidad favorecen la extracción selectiva de aquellos triglicéridos de menor punto de fusión, como son los PUFAs.

Los resultados que se refieren a la variación en la extracción de los triglicéridos según su NC concuerdan con los aportados anteriormente en los trabajos realizados sobre la composición de grasa láctea y su extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, teniendo en cuenta que los sustratos utilizados en los anteriores trabajos son mantequilla (con el signo contrario de emulsión) y grasa anhidra. Esto mismo ocurre con los resultados que se refieren a la extracción diferencial según sean los triglicéridos saturados o insaturados.

Los resultados referentes a la extracción de triglicéridos con insaturaciones en *cis* o *trans* son los primeros realizados, igualmente a los que se refieren a la extracción de los ácidos grasos de cadena corta y los PUFAs, y no han podido ser contrastados con otros resultados de la bibliografía, ya que los estudios realizados por otros investigadores solamente analizan las diferencias entre la extracción de triglicéridos saturados o insaturados debido a que los métodos de análisis empleados generalmente (GC) no distinguen entre isómeros geométricos. Por la misma razón, el resto de resultados no son totalmente comparables, ya que la nata es un sustrato que no ha sido utilizado para la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, la única referencia es el trabajo de Hierro (1994).

Las mayores ventajas del análisis de extractos por espectrometría de <sup>13</sup>C-RMN han sido la sencillez en la preparación de la muestra, la posibilidad de realizar un análisis de mezclas complejas sin previa purificación de la muestra y la consecuentemente rápida obtención de resultados, y que sea un método no destructivo. Por contra, inconveniente ha sido la baja sensibilidad que impide la detección de compuestos minoritarios, como el colesterol, que sin embargo es cuantificable por HPLC. La espectrometría de <sup>13</sup>C-RMN ha podido ser utilizada como complemento al análisis de triglicéridos por HPLC. Resulta una técnica de elección para cuantificar parámetros, que para el HPLC son más complejos de averiguar, muy útiles a la hora de establecer la influencia de las condiciones

de extracción supercrítica (presión y temperatura) sobre la grasa láctea: influencia sobre la extracción de los ácidos de cadena corta (separadamente butírico, caproico y caprílico), influencia sobre la extracción de triglicéridos con distinta isomería geométrica, y con diferente grado de saturación. En este sentido, la RMN aporta datos novedosos sobre los resultados de la extracción con dióxido de carbono supercrítico sobre la grasa de la nata.

### ***Capítulo 3.***

***Aplicación de la extracción con dióxido de carbono  
supercrítico a la modificación del destilado de la  
desodorización de aceites vegetales***

### 3.1- INTRODUCCIÓN

#### 3.1.1- Los aceites vegetales

Los aceites vegetales son productos naturales y, como tales, contienen muchas clases de compuestos diferentes. Los triglicéridos son los componentes mayoritarios, constituyendo más del 95% del aceite. Sin embargo los componentes minoritarios son también de gran importancia, tanto para evaluar la calidad del aceite, procedencia o adulteraciones posibles como por ser de interés en la industria química, alimentaria o cosmética, como los tocoferoles, esteroides, escualeno, etc.

#### 3.1.2- El aceite de oliva

El aceite de oliva es el procedente únicamente de los frutos del olivo (*Olea europaea*) con exclusión de los aceites obtenidos por disolventes, o de orujo de aceituna refinado, o por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza. Este aceite es de gran importancia económica en los países mediterráneos, particularmente en España.

Dentro del aceite de oliva, a nivel comercial, se distinguen varios tipos (Madrid, 1986, C.O.I., 24-11-1995):

Aceite de oliva virgen. Aceite obtenido del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos o por otros medios físicos en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite, que no hayan tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado. No se considerará apto para el consumo humano el aceite de oliva virgen lampante.

Aceite de oliva refinado. Aceite de oliva obtenido del aceite de oliva virgen mediante

técnicas de refinado que no provoquen modificaciones de la estructura glicerídica inicial.

Aceite de oliva (antes aceite puro de oliva o 100% puro de oliva). Aceite constituido por una mezcla de aceite de oliva virgen apto para el consumo en la forma en que obtiene y de aceite de oliva refinado.

Aceite lampante es aquel de sabor defectuoso o de acidez superior al 3%, por lo que no se considera comestible.

Aceite de orujo de oliva refinado es el aceite obtenido por tratamiento con disolventes de los orujos de oliva, con exclusión de los aceites obtenidos por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza.

### *3.1.3- Aceites de semillas oleaginosas*

Son los aceites obtenidos de las semillas oleaginosas expresamente autorizadas de acuerdo con las normas establecidas en la reglamentación y sometidas a refinación completa previamente a su utilización como aceites para consumo humano (Madrid, 1986). A nivel mundial, estos aceites se consumen y producen en mayor cantidad que el de oliva, si bien, en España no tienen tanta importancia socioeconómica.

Entre otros, podemos citar el aceite refinado de girasol, maíz, pepita de uva, cártamo (producidos enteramente en España), soja, cacahute, colza, algodón y mezclas de dos o más de ellos.

Los aceites de semillas no suelen comercializarse sin refinar, porque suelen proceder de una extracción con disolventes (como el hexano) y, en menor medida, de una extracción mecánica.



#### 3.1.4- Desodorización del aceite de oliva

El aceite de oliva necesita ser refinado cuando no es de buena calidad, lo que sucede cuando se extrae de aceitunas tratadas de forma poco adecuada. Actualmente, la cantidad de aceite de oliva sometido a refinación ha disminuido debido a la mejora de los métodos de recolección, almacenamiento, procesado y otros factores. Sin embargo, el aceite de oliva que tiene que ser refinado se suele someter a varias o a todas de las operaciones siguientes:

- eliminación de sustancias resinosas,
- neutralización de los ácidos grasos libres,
- desodorización,
- decoloración.

La desodorización es el proceso de eliminación de las sustancias responsables de los malos olores y sabores (aldehídos y cetonas sobre todo). Este proceso se lleva a cabo a baja presión (3-5 mm Hg) y a alta temperatura (180-250 °C). La desodorización se suele aplicar a aceites viejos que han desarrollado malos olores por oxidación. El aceite de oliva fresco rara vez necesita ser desodorizado. Con la desodorización se eliminan también los residuos de plaguicidas (Kiritsakis, 1992). En los últimos años se ha extendido mucho el uso de la llamada «refinación física» del aceite de oliva, que consiste en suprimir la etapa de neutralización separando los ácidos grasos libres (con el resto de materias volátiles y algo de aceite neutro arrastrado) en el curso de la desodorización con vapor de agua. Los productos arrastrados son principalmente ácidos grasos, glicéridos y compuestos insaponificables, encontrándose estos últimos en proporción mucho más alta que en el aceite de partida. Este hecho aumenta el interés por el estudio del subproducto obtenido, pudiéndose revalorizar, y que, además, se produce en cantidades cada día mayores a medida que se extiende la utilización de la refinación física (Martínez-Moreno y Serra-Masía, 1980).

El interés del destilado de la desodorización radica principalmente en la elevada proporción de compuestos insaponificables que posee. De ellos, el escualeno es el más abundante, seguido, en mucha menor cantidad de compuestos esterólicos, pudiéndose utilizar el destilado como fuente de estos compuestos. El escualeno es un hidrocarburo presente en abundancia en algunos aceites de pescado y normalmente se usa como agente humectante o emoliente en cosmética, además de poseer interés por ser precursor en la biosíntesis del colesterol (Bondioli y col., 1993). Una razón que limita el uso del escualeno en cosmética es la incertidumbre de su disponibilidad como resultado de convenios de protección de los animales marinos que son su fuente primaria de obtención. Este hecho ha aumentado el interés hacia el aprovechamiento de aceites vegetales y, sobre todo, de los subproductos de su elaboración, ya que son relativamente abundantes, más baratos y ricos en este compuesto. Otros compuestos presentes en el destilado también son de interés, como el  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol, que se ha visto que poseen actividad sinérgica hipoglucemiante (Jamaluddin y col., 1994).

La metodología analítica de los esteroides en grasas, aceites y alimentos en general se basa normalmente en la extracción de la materia insaponificable, aislamiento de la fracción de esteroides por cromatografía en capa fina y separación de los componentes de la fracción por cromatografía gaseosa. Este método es el oficial según la legislación española para esteroides en grasas y aceites (B.O.E. núm. 274, 15 de noviembre de 1985). Otros métodos incluyen la utilización de una columna de cromatografía líquida preparativa sustituyendo la saponificación (Worthington y Hitchcock, 1984), o se basan en el acoplamiento LC-GC (Grob y col., 1992; Artho y col., 1993; Señoráns, 1996) o en la sustitución del análisis mediante GC por el de HPLC utilizando detectores de variación del índice de refracción o UV (Cortesi y col., 1977; Holen, 1985). La desventaja que presenta el uso de los detectores de índice de refracción o ultravioleta ( $\lambda$  entre 205 y 210 nm) en el análisis de esteroides por HPLC es que no permiten hacer gradientes y por lo tanto es difícil conseguir un método que permita separar mezclas de un gran número de esteroides. Para

aumentar la resolución sería necesario el empleo de gradiente de fase móvil. Por ello en este apartado se estudió inicialmente la aplicación del detector de masa, utilizado ya en el análisis de otros componentes lipídicos como los triglicéridos. Además, el detector de masa se puede utilizar para cuantificar escualeno junto con un número amplio de esteroides.

Los análisis de escualeno siguen los mismos métodos que los más comunes para el análisis de la fracción esteróica, es decir, la separación mediante cromatografía de gases tras la saponificación y la preseparación por cromatografía en capa fina, como es el utilizado por Bondioli y col. (1993) para el análisis de los extractos de DDO obtenidos mediante extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. Otros métodos más recientes para el análisis en alimentos de escualeno utilizan la cromatografía de fluidos supercríticos (Staby y col., 1994), la espectroscopía de <sup>13</sup>C-RMN (Zamora y col., 1994), y el acoplamiento LC-GC directo (Grog y col., 1992; Artho y col., 1993; Señoráns, 1996).

## **ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DEL DESTILADO DE LA DESODORIZACIÓN DE ACEITES VEGETALES MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

### **3.2- MATERIALES Y MÉTODOS**

#### ***3.2.1- Preparación de la muestra***

Las muestras de destilado de la desodorización de aceite de oliva y girasol provinieron del Instituto de la Grasa (C.S.I.C., Sevilla) y se mantuvieron en congelador hasta el momento de su uso.

A 1 g de destilado se le añaden 50 mL de KOH metanólica 2N preparada en el día. Esta mezcla se pone a calentar a reflujo durante 30 min. La solución restante se lleva a una

ampolla de decantación, y el matraz se lava con dos porciones de 25 mL de agua destilada que también se llevan al embudo. Se añaden 10 mL de una solución de NaCl al 10% y se extrae con dos porciones de 100 mL de éter etílico/éter de petróleo (1:1). Se recogen las fases etéreas, se concentran con un rotavapor hasta un volumen aproximado de 5 mL y se filtran con papel separador de fase Wathman 1PS para eliminar restos de fase hidroalcohólica; posteriormente se llevan a sequedad con el rotavapor. El residuo obtenido se redissuelve en 1 mL de acetona para el análisis de los esteroides. De la disolución anterior se reservan 0,5 mL y se llevan con acetona a un volumen final de 5 mL para el análisis de escualeno.

### 3.2.2- Descripción del equipo

El sistema cromatográfico utilizado consistió en dos bombas modelo 125 (Beckman), un inyector Rheodyne modelo 7125 con un bucle de carga de 20  $\mu$ L, se utilizaron varias columnas de acero inoxidable (para la optimización del análisis cualitativo, apartado 3.2.3.1) de 4,6 mm de d.i. rellenas con Spherisorb ODS-2 de tamaño de partícula variable (Phase Separations, Symta) en un baño de agua para el control de la temperatura. El detector de masa fue un ACS 750/14 (The Arsenal) con una temperatura en el evaporador de 45 °C y 172 kPa de presión de aire, condiciones que se variaron para la realización del análisis cuantitativo. El aire a presión fue proporcionado por un compresor (Air Control) y posteriormente secado por dos trampas de agua. Se utilizaron balas de aire para alcanzar presiones de 276 kPa en el evaporador durante el estudio del detector, ya que el compresor solamente proporcionaba presiones máximas de 210 kPa. Los vapores formados eran eliminados por medio de un extractor. Los datos eran adquiridos a través de una interfase modelo 406 (Beckman) hasta un System Gold (Beckman).

La fase móvil consistió en eluciones en isocrático o gradiente de metanol, etanol o isopropanol en acetonitrilo, todos de grado HPLC (apartado 3.2.3.2). El flujo empleado fue

de 1,5 mL/min. Los métodos de elución de la fase móvil fueron controlados mediante el programa System Gold (Beckman).

### 3.2.3- Análisis cualitativo

La optimización en el análisis cualitativo se llevó a cabo para identificar los picos de las muestras y para conseguir, en análisis de corta duración, una buena resolución entre los compuestos que facilitara la posterior cuantificación. Para ello, se combinaron distintas condiciones de longitud de columna y tamaño de partícula, tipo y proporción de modificador, temperatura de la columna y elución isocrática o con gradiente de polaridad. Posteriormente se realizó un estudio estadístico de los factores de capacidad ( $k'$ ) y resolución (R) de pares críticos.

El análisis cualitativo se llevó a cabo inyectando por triplicado soluciones metanólicas de desmosterol, ergosterol, lanosterol, fucosterol, colesterol, estigmasterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol y escualeno (Sigma Chemical) en concentraciones de 10 mg/mL.

#### 3.2.3.1- Elección de la columna

Para es estudio del tipo de columna se utilizaron las tres que se disponían en el laboratorio, que presentaban tres longitudes diferentes y dos tamaños de partícula:

- 7,5 cm longitud, 3  $\mu$ m tamaño de partícula
- 15            "        5                "
- 20            "        3                "

### 3.2.3.2- Elección de la fase móvil

La fase móvil estuvo constituida por acetonitrilo y un modificador de la polaridad. El orden de polaridad de los eluyentes a la temperatura de estudio (45 °C) fue el siguiente:

acetonitrilo > metanol > etanol > *iso*-propanol.

Como estimación de la polaridad del modificador se utilizó la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) medida a temperatura ambiente a la hora de realizar los cálculos en la obtención de los resultados. Las constantes son las siguientes:

- acetonitrilo,  $\epsilon = 37,50$ ;
- metanol,  $\epsilon = 32,63$ ;
- etanol,  $\epsilon = 24,30$ ;
- *iso*-propanol,  $\epsilon = 18,30$ .

En primer lugar se realizaron estudios en elución isocrítica utilizando cada uno de los modificadores en proporciones de 0 a 100%.

### 3.2.3.3- Elección del gradiente

La elección de gradiente se llevó a cabo utilizando la columna de 20 cm. Se realizaron gradientes de metanol en acetonitrilo de:

- 1, 2, 3, 4 y 5%/min a partir del 0%,
- 4,5%/min a partir del 10%,
- 4%/min a partir del 20%.

#### 3.2.3.4- Elección de la temperatura de la columna

Se estudió la resolución en función de la temperatura de la columna. Para ello se programó la temperatura del baño de agua a 35, 45 y 55 °C. Este estudio se realizó utilizando la columna de 20 cm y un gradiente de metanol en acetonitrilo del 3%/min.

#### 3.2.3.5- Análisis estadístico

Los resultados sobre tiempos de retención de los patrones en cada una de las condiciones estudiadas se utilizaron para establecer ecuaciones que relacionaran el  $k'$  con las variables del sistema cromatográfico. En los casos en los que aparecieron pares críticos, la utilización únicamente de  $k'$  para la valoración de los resultados carecía de consistencia, por lo que se decidió tener en cuenta la anchura de los picos calculando la resolución y establecer, así, las mejores condiciones de elución. La decisión del cálculo de la resolución se debió principalmente a que el acetonitrilo de la fase móvil producía un distanciamiento de los  $k'$ , favoreciendo la separación; sin embargo, también se favorecía la formación de colas en los picos, produciéndose solapamientos que podrían dificultar la cuantificación. La resolución se calculó a partir de la anchura del pico en la base, midiéndose ésta de forma manual, ya que el programa informático disponible (Suitability de System Gold) no apreciaba la formación de colas. En los casos en los que los picos aparecieron solapados se utilizó el programa Peakfit de Jandel Scientific, versión V3.11B para la descomposición en gaussianas y posterior medida de las anchuras. La resolución se calculó según la ecuación:

$$R = \frac{\Delta t_r}{\frac{W_{b1} + W_{b2}}{2}}; \quad (3.1)$$

siendo:

$R$  la resolución,

$\Delta t_r$  la variación en los tiempos de retención del par crítico 1 y 2,

$W_{bi}$  la anchura en la base de los picos 1 y 2.

Las ecuaciones que relacionan  $k'$  y  $R$  con las variables del método de separación se obtuvieron mediante los programas 1R y 9R de regresión lineal múltiple de BMDP. El programa 9R tiene la ventaja sobre el 1R de que posee menores valores de tolerancia y ofrece unos segundos resultados alternativos tras eliminar los puntos anómalos o fuera de rango. Además, da los valores de error de estimación y predicción.

### 3.2.4- Análisis cuantitativo

#### 3.2.4.1- Estudio del detector. Análisis estadístico

El detector de masa posee amplias posibilidades aplicado al análisis de compuestos lipídicos, compuestos para los que el detector de índice de refracción y el ultravioleta no permiten la utilización de gradientes de polaridad. En la mayoría de los casos, las razones que conducen al uso de este detector son:

- la necesidad de utilizar gradientes de elución para poder separar los componentes de mezclas complejas, como son algunas grasas naturales,
- las fases móviles más convenientes para estas separaciones absorben en la región UV,
- los compuestos a analizar absorben poco a longitudes de onda superiores a 200 nm.

Este detector puede ser utilizado con cualquier disolvente o mezclas de éstos, siempre que sean suficientemente volátiles y sobre todo, en relación a los solutos, que no se



volatilicen en las condiciones del evaporador. En la figura 3.2.4.1 se muestra un esquema del funcionamiento del detector. La fase móvil con compuestos ya separados es nebulizada por medio de la entrada de aire a presión, que es factor determinante en el tamaño de las gotas formadas. Esta nebulización favorece la posterior volatilización en el evaporador, que se mantiene a una temperatura a la que se volatilice la fase móvil, pero no los solutos. Finalmente, los compuestos a detectar quedan formando pequeñas partículas sólidas que provocan la desviación de un haz de luz (principalmente por reflexión y refracción, Charlesworth, 1978), la luz dispersada se detecta en un fotomultiplicador y es directamente proporcional a la masa de soluto. Además de la volatilidad del soluto, también influyen en la detección su estructura química y la cantidad inyectada, ya que son otros factores que determinan el tamaño y número de partículas formadas en el proceso de detección.

Se ha descrito por varios investigadores que la respuesta del detector de masa no es lineal y que además depende fuertemente de la temperatura del evaporador y, en menor medida, de la presión del aire en el nebulizador y la cantidad inyectada (Charlesworth, 1978; Macrae y Dick, 1981; Macrae y col., 1982; Stolyhwo y col., 1983, 1984, 1985 y 1987; Mourey y Oppenheimer, 1984; Perrin y Prevot, 1984; Oppenheimer y Mourey, 1985; Warner y Mounts, 1990; Hopia y col., 1992; Dreux y col., 1996). Sin embargo, a pesar de las variaciones que se puedan producir en las respuestas, se puede asumir que, en un rango de cantidades de soluto, el área del pico ( $A$ ) se relaciona con la masa ( $m$ ) mediante la siguiente relación exponencial:

$$A = am^x; (3.2)$$

donde  $a$  y  $x$  son coeficientes dependientes del tamaño de las gotas, concentración y naturaleza del soluto, presión del evaporador y extractor, y temperatura del evaporador.

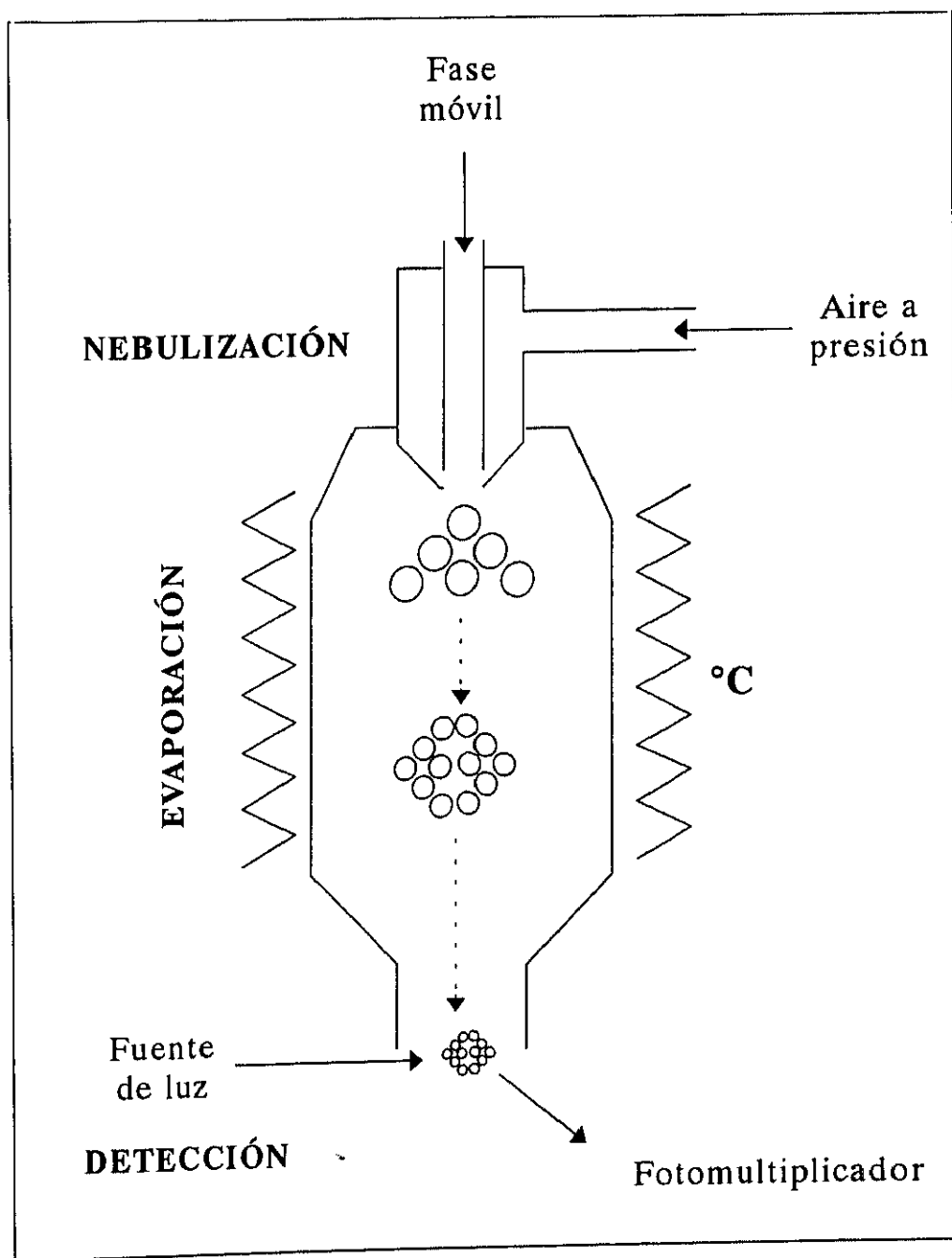


Figura 3.2.4.1. Esquema de un detector de masa

La transformación logarítmica de la ecuación anterior, sin embargo, muestra ya una dependencia lineal entre los logaritmos de  $A$  y  $m$ :

$$\log A = x \log m + \log a; (3.3)$$

Los valores de  $x$  encontrados en la bibliografía se encuentran entre 0,9 y 1,8, siendo correctos todos ellos al entrar dentro del intervalo teórico establecido 0,66-2,0, si bien, la respuesta será más próxima a la linealidad con valores de  $x$  más cercanos a la unidad. Charlesworth (1978) realiza un estudio profundo del detector y concluye que, para concentraciones elevadas y dependiendo del resto de condiciones, la respuesta pasa de exponencial a sigmoideal, encontrándose un pequeño intervalo intermedio de concentraciones donde la respuesta es lineal.

En el presente trabajo se decidió estudiar la temperatura del evaporador y presión del aire para optimizar la relación área/masa según los modelos propuestos. Las temperaturas y presiones máximas y mínimas vinieron dadas por las limitaciones del detector y compresor, y por el aumento en exceso del nivel de ruido basal.

Las condiciones estudiadas fueron las siguientes:

- se inyectaron por triplicado disoluciones de 10 y 20  $\mu\text{g}$  de ergosterol, colesterol, estigmasterol y escualeno en acetona,
- las temperaturas del evaporador estudiadas fueron de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 80 y 96  $^{\circ}\text{C}$  a una presión de 172 kPa,
- se estudiaron temperaturas de 25, 45, 60, 80 y 96  $^{\circ}\text{C}$  a las presiones de 103, 207 y 276 kPa.

Los resultados se procesaron mediante el programa 9R del BMDP para conseguir que las respuestas de los distintos patrones fueran los más semejantes y elevadas posibles.

#### 3.2.4.2- Linealidad de la respuesta

Se inyectaron por duplicado dos disoluciones de ergosterol, colesterol, estigmasterol y escualeno en las cantidades de 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 30 y 40  $\mu\text{g}$ , y 85  $\mu\text{g}$  de escualeno.

Una vez establecidas las condiciones de presión y temperatura del detector se obtuvieron las ecuaciones que relacionaron la respuesta con la cantidad inyectada (la adecuación a la linealidad era menos satisfactoria si los ensayos se realizaban en condiciones no optimizadas del detector de masa). La linealidad de la respuesta se calculó según el modelo descrito en el apartado anterior. Las operaciones se realizaron mediante el programa 9R de regresión lineal simple del BMDP.

#### 3.2.4.3- Cálculo del factor de respuesta

En el cálculo del factor de respuesta se decidió utilizar ergosterol como patrón interno, ya que no se presentaba en las muestras de destilado de la desodorización de aceite de oliva ni girasol, y se resolvía bien respecto a los compuestos de interés de las muestras y otros componentes no identificados.

Se inyectaron por duplicado dos soluciones con cada una de las siguientes cantidades:

- 10  $\mu\text{g}$  de ergosterol,
- 2,5; 5; 10; 20; 30 y 40  $\mu\text{g}$  de colesterol, estigmasterol y escualeno.

Dado que el análisis cuantitativo con el factor de respuesta se basa en el cálculo por mínimos cuadrados, es decir, regresión lineal, se transformaron los parámetros en una

forma logarítmica que garantiza la relación lineal simple entre la respuesta y la cantidad inyectada:

$$F_i = \frac{\log A_i \cdot \log C_{PI}}{\log A_{PI} \cdot \log C_i}; (3.4)$$

siendo:

$F_i$  el factor de respuesta del compuesto  $i$ ,

$C_i$  la concentración del compuesto  $i$ ,

$C_{PI}$  la concentración del patrón interno,

$A_i$  el área del compuesto  $i$ ,

$A_{PI}$  el área del patrón interno.

#### 3.2.4.4- Precisión del método

La precisión de todo el método analítico, incluido el proceso de preparación de muestra, se estimó analizando por duplicado 5 hidrólisis de un mismo destilado de oliva, adicionando 1 mg de ergosterol como patrón interno, y se calculó la desviación estándar relativa.

### **3.3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.3.1- Análisis cualitativo**

##### 3.3.1.1- Análisis estadístico en la elección de la columna y la fase móvil

Los resultados de  $k'$  obtenidos tras la inyección de los patrones permitieron el estudio de la variación del  $\log k'$  de cada uno de ellos frente al tipo de columna utilizada, tipo de

modificador y porcentaje en el que se encontraba en la fase móvil. En el caso del *iso*-propanol, no se pudo hacer el estudio con la columna de 20 cm y 3  $\mu$ m porque las mezclas con acetonitrilo daban presiones excesivamente altas; lo mismo ocurría con el etanol. En el caso de la columna de 7,5 cm prácticamente no hay separación con porcentajes superiores al 2% por lo que no se ha tenido en cuenta. Las ecuaciones obtenidas son las siguientes:

A- Metanol, columna de 7,5 cm, 3  $\mu$ m:

- Desmosterol:	$\log k' = 1,76 - 0,00193 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9861;$
- Ergosterol:	$\log k' = 1,83 - 0,00282 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9816;$
- Lanosterol:	$\log k' = 1,91 - 0,00266 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9891;$
- Fucosterol:	$\log k' = 1,94 - 0,00315 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9880;$
- Colesterol:	$\log k' = 1,96 - 0,00327 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9933;$
- Stigmasterol:	$\log k' = 2,01 - 0,00356 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9938;$
- Campesterol:	$\log k' = 2,02 - 0,00355 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9836;$
- $\beta$ -Sitosterol:	$\log k' = 2,08 - 0,00371 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9889;$

B- Metanol, columna de 15 cm, 5  $\mu$ m:

- Desmosterol:	$\log k' = 1,11 - 0,00272 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9309;$
- Ergosterol:	$\log k' = 1,14 - 0,00293 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9229;$
- Lanosterol:	$\log k' = 1,24 - 0,00302 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9823;$
- Fucosterol:	$\log k' = 1,27 - 0,00339 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9446;$
- Colesterol:	$\log k' = 1,29 - 0,00361 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9669;$
- Stigmasterol:	$\log k' = 1,34 - 0,00378 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9800;$
- Campesterol:	$\log k' = 1,36 - 0,00376 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9085;$
- $\beta$ -Sitosterol:	$\log k' = 1,40 - 0,00383 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9729;$

C- Metanol, columna de 20 cm, 3  $\mu$ m:

- Ergosterol:	$\log k' = 1,78 - 0,00228 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9537;$
---------------	--	-----------------

- Lanosterol:	$\log k' = 1,85 - 0,00230 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9851;$
- Fucosterol:	$\log k' = 1,89 - 0,00255 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9563;$
- Colesterol:	$\log k' = 1,91 - 0,00282 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9814;$
- Estigmasterol:	$\log k' = 1,95 - 0,00300 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9838;$
- Campesterol:	$\log k' = 1,96 - 0,00292 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9779;$
- $\beta$ -Sitosterol:	$\log k' = 2,00 - 0,00313 \cdot \% \text{MeOH};$	$r^2 = 0,9841;$

D- Etanol, columna de 15 cm, 5  $\mu\text{m}$ :

- Desmosterol:	$\log k' = 1,11 - 0,00788 \cdot \% \text{EtOH};$	$r^2 = 0,9668;$
- Ergosterol:	$\log k' = 1,14 - 0,00806 \cdot \% \text{EtOH};$	$r^2 = 0,9651;$
- Lanosterol:	$\log k' = 1,23 - 0,00883 \cdot \% \text{EtOH};$	$r^2 = 0,9898;$
- Fucosterol:	$\log k' = 1,26 - 0,00907 \cdot \% \text{EtOH};$	$r^2 = 0,9707;$
- Colesterol:	$\log k' = 1,27 - 0,00911 \cdot \% \text{EtOH};$	$r^2 = 0,9788;$
- Estigmasterol:	$\log k' = 1,33 - 0,00954 \cdot \% \text{EtOH};$	$r^2 = 0,9846;$
- Campesterol:	$\log k' = 1,34 - 0,00962 \cdot \% \text{EtOH};$	$r^2 = 0,9779;$
- $\beta$ -Sitosterol:	$\log k' = 1,39 - 0,01005 \cdot \% \text{EtOH};$	$r^2 = 0,9843;$

E- *iso*-Propanol, columna de 15 cm, 5  $\mu\text{m}$ :

- Desmosterol:	$\log k' = 1,10 - 0,00911 \cdot \% \text{iPrOH};$	$r^2 = 0,9750;$
- Ergosterol:	$\log k' = 1,13 - 0,00940 \cdot \% \text{iPrOH};$	$r^2 = 0,9706;$
- Lanosterol:	$\log k' = 1,22 - 0,01018 \cdot \% \text{iPrOH};$	$r^2 = 0,9881;$
- Fucosterol:	$\log k' = 1,25 - 0,01049 \cdot \% \text{iPrOH};$	$r^2 = 0,9734;$
- Colesterol:	$\log k' = 1,27 - 0,01065 \cdot \% \text{iPrOH};$	$r^2 = 0,9824;$
- Estigmasterol:	$\log k' = 1,32 - 0,01113 \cdot \% \text{iPrOH};$	$r^2 = 0,9870;$
- Campesterol:	$\log k' = 1,33 - 0,01122 \cdot \% \text{iPrOH};$	$r^2 = 0,9809;$
- $\beta$ -Sitosterol:	$\log k' = 1,38 - 0,01170 \cdot \% \text{iPrOH};$	$r^2 = 0,9854.$

Las figuras 3.3.1.1(a-e) son las representaciones gráficas de las ecuaciones anteriores. Se observó que la variación del factor de capacidad en función del tipo de modificador era

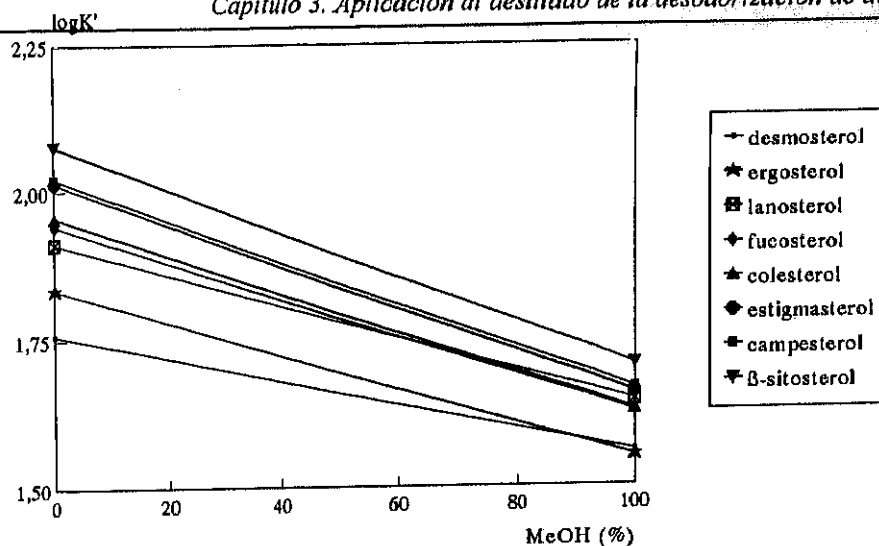


Figura 3.3.1.1a. Influencia de la proporción de metanol en la variación de  $k'$ . Columna de 7,5 cm de longitud.

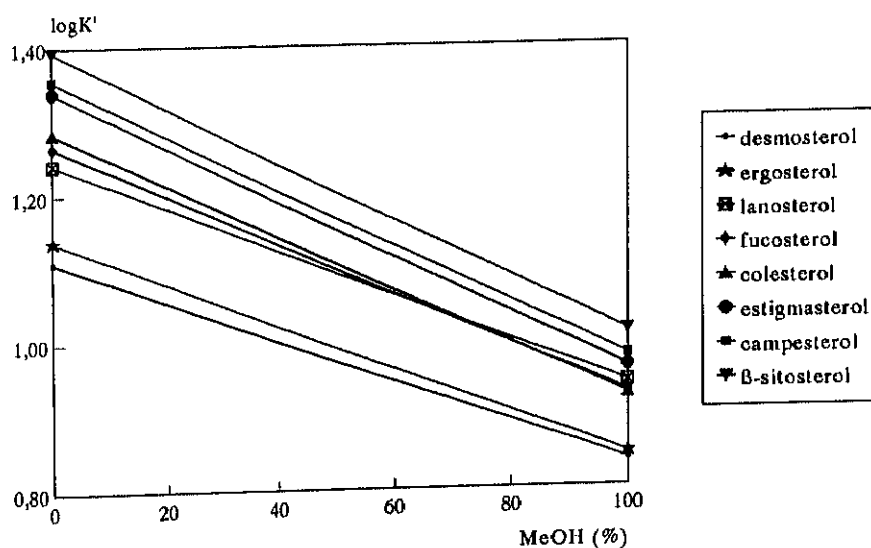


Figura 3.3.1.1b. Influencia de la proporción de metanol en la variación de  $k'$ . Columna de 15 cm de longitud.

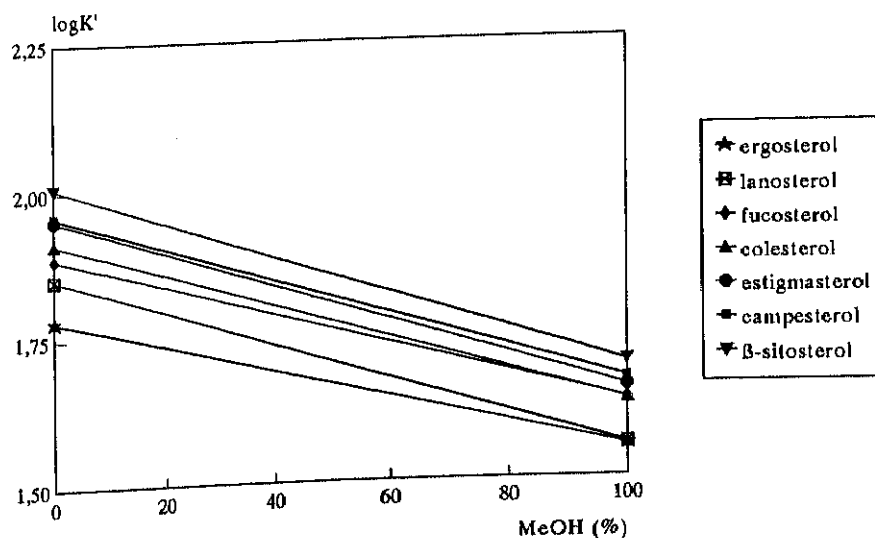


Figura 3.3.1.1c. Influencia de la proporción de metanol en la variación de  $k'$ . Columna de 20 cm de longitud.



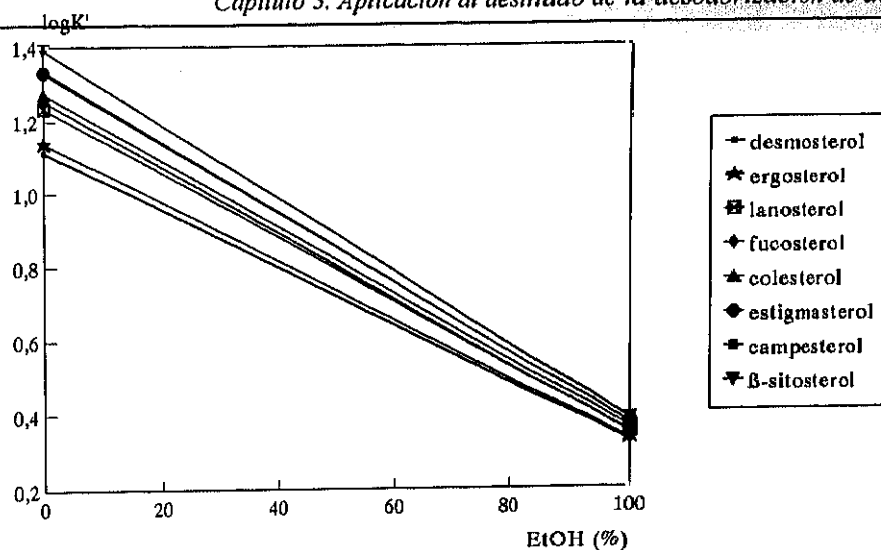


Figura 3.3.1.1d. Influencia de la proporción de etanol en la variación de  $K'$ . Columna de 15 cm.

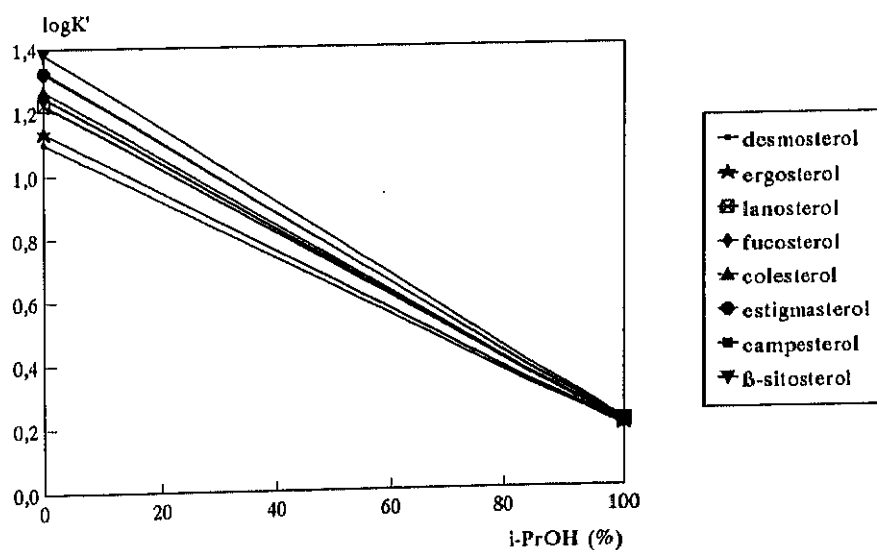
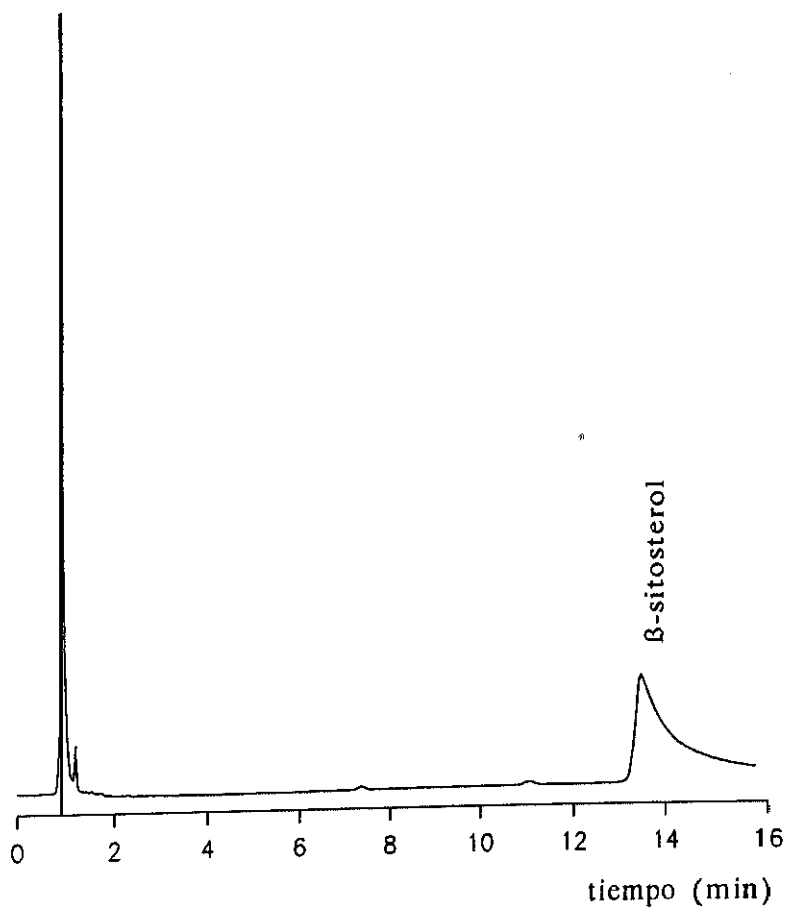


Figura 3.3.1.1e. Influencia de la proporción de iso-propanol en la variación de  $K'$ . Columna de 15 cm de longitud.



**Figura 3.3.1.1f. Análisis de  $\beta$ -sitosterol por HPLC en las siguientes condiciones:**

- columna: 15 cm,
- tamaño de partícula: 5  $\mu$ m,
- fase móvil: acetonitrilo 100%
- detector: UV.

más evidente en el *iso*-propanol, seguido del etanol y metanol respectivamente debido a que la menor polaridad del modificador causa una elución más rápida de los solutos. En el caso de utilizar *iso*-propanol, el  $\log k'$  descendió hasta 0,2 aproximadamente y para todos los compuestos del estudio, para el caso de la utilización de etanol  $\log k'$  fue de  $\approx 0,4$ . En ambos casos la duración de los análisis es corta, sin embargo, esto hacer empeorar la resolución entre los compuestos eluidos. El empleo de metanol condujo a mayores tiempos de retención que el etanol e *iso*-propanol para iguales porcentajes en la fase móvil; de este modo, la separación de los diferentes compuestos fue más satisfactoria. La utilización de bajos porcentajes de modificador e, incluso, de 100% de acetonitrilo en la fase móvil conducía a la máxima separación de los compuestos analizados, sin embargo, la resolución no era aceptable debido a que los picos presentaban importantes colas. La figura 3.3.1.1f muestra un cromatograma de estas características, donde se aprecia la aparición de la cola en el pico de  $\beta$ -sitosterol. Al comparar la variación del  $\log k'$  respecto a la longitud de columna (columnas de 20 y 7,5 cm) se observó que la columna de mayor longitud producía resultados más satisfactorios que los de la de menor longitud, además de que los  $\log k'$  estaban más distanciados entre cada compuesto. El hecho de encontrar valores de  $\log k'$  mucho menores en la columna de 15 cm no se debe a la longitud sino al tamaño de partícula, observándose que la utilización de partículas de 5  $\mu\text{m}$  conduce a la obtención de menores tiempos de retención que el uso de partículas de 3  $\mu\text{m}$ . De este modo, y en una primera aproximación a los resultados finales, se podía asegurar la conveniencia de la utilización de la columna de 20 cm de longitud, 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula y metanol como modificador, para evitar al máximo la coelución de los compuestos de la mezcla.

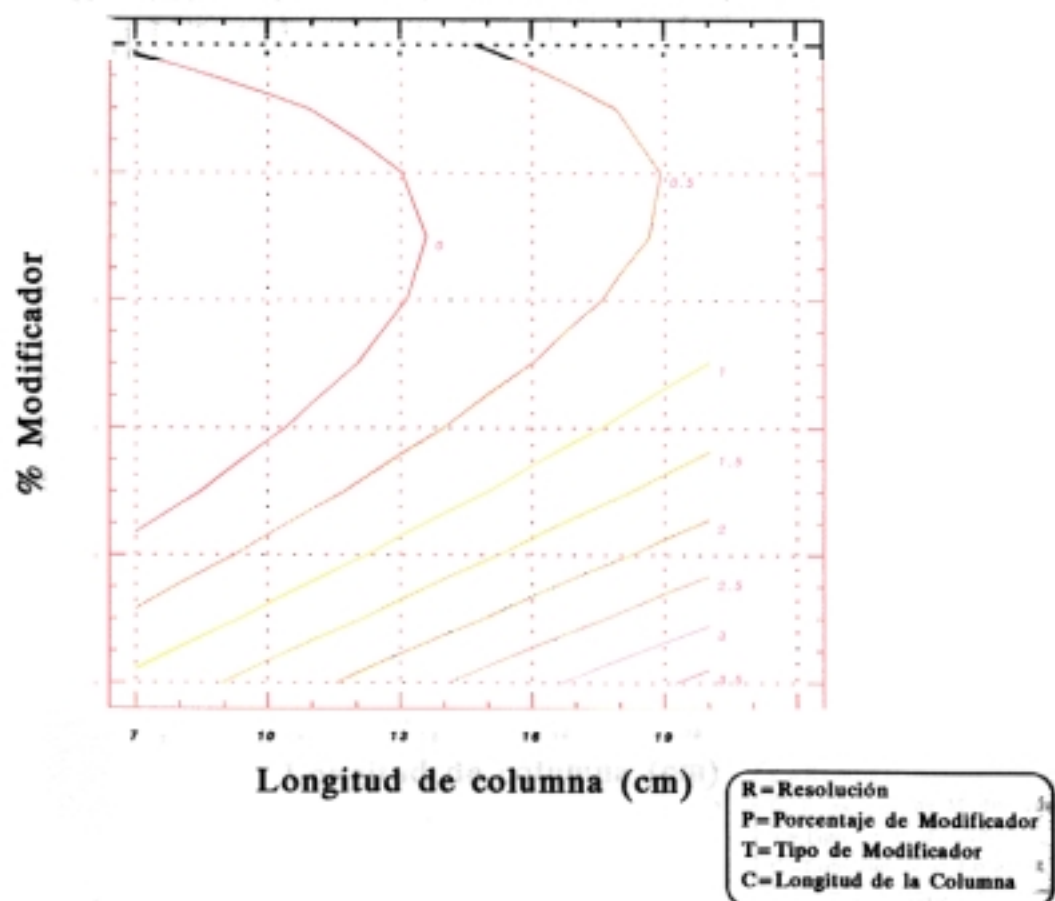
Posteriormente se estudió la resolución de los pares críticos, ya que se vió que algunos picos presentaban colas con baja proporción de modificador. Se calculó la variación de la resolución según el tipo y porcentaje de modificador en el caso de la utilización de la columna de 15 cm y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. La longitud de columna se estudió para los casos de 7,5 y 20 cm, ya que poseían el mismo tamaño de partícula (3  $\mu\text{m}$ ) y con

metanol como modificador. Los resultados fueron los que aparecen en las figuras 3.3.1.1g-p).

Las figuras 3.3.1.1g y h muestran cómo los mejores resultados en la resolución se consiguen al aumentar la longitud de la columna y disminuir el porcentaje de modificador; sin embargo, la resolución entre estigmasterol y campesterol mejora al aumentar el porcentaje de metanol (figura 3.3.1.1j). La resolución entre fucosterol y colesterol solamente mejora al aumentar la longitud de la columna a partir de los 12 cm (figura 3.3.1.1y). En cuanto a lo referido al tipo de modificador, para el par crítico desmosterol-ergosterol (figura 3.3.1.1k) la máxima resolución se consiguió utilizando etanol en un 20%, si bien, la resolución dependió poco del tipo de modificador y más del porcentaje en que se encontraba en la fase móvil. La resolución entre el lanosterol y el fucosterol (figura 3.3.1.1l) fue baja independientemente del tipo de modificador empleado, incluso sin modificador. Hay que puntualizar que este estudio, el de la resolución en función del tipo de modificador, se llevó a cabo utilizando la columna de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula del relleno, y es fácilmente apreciable que la resolución aumenta sensiblemente al cambiar a al tamaño de 3  $\mu\text{m}$ : la gráfica 3.3.1.1g sobre la resolución entre el lanosterol y fucosterol se basa en columnas de 3  $\mu\text{m}$  y muestra que para una supuesta longitud columna de 15 cm la resolución conseguida es siempre superior a la de los resultados obtenidos en 3.3.1.1l. Los resultados de la resolución entre lanosterol-colesterol, fucosterol-colesterol y estigmasterol-campesterol (figuras 3.3.1.1(m-ñ)) son semejantes a los obtenidos en el caso del par lanosterol-fucosterol, observándose un ligero aumento de la resolución al aumentar la polaridad del modificador, excepto para el par lanosterol-colesterol, aunque sus resultados muestran valores altos de resolución. La figura 3.3.1.1o muestra cómo la resolución entre el par crítico desmosterol-ergosterol disminuye de modo apreciable al aumentar el porcentaje del modificador, coincidiendo con los resultados aportados anteriormente (figuras 3.3.1.1(g-i)). La resolución entre el ergosterol y el lanosterol, utilizando metanol y la columna de 20 cm (figura 3.3.1.1p) muestra siempre valores altos, pero son los mayores los encontrados para porcentajes alrededor del 50%.

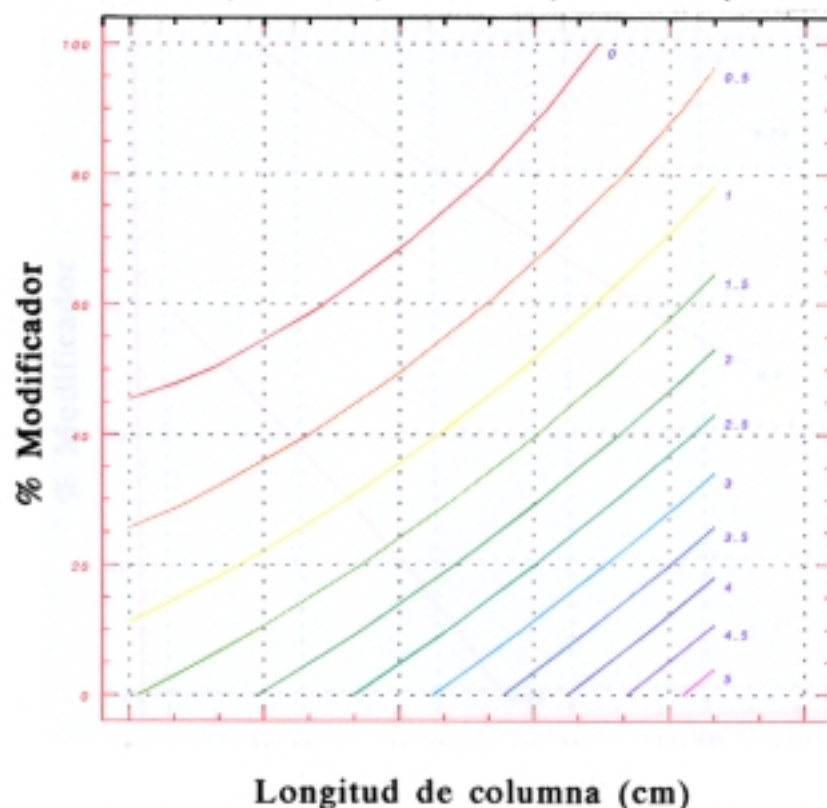
### Resolución Lanosterol-Fucoesterol

$$R = -0,243 + 0,1944C - 0,0498P + 0,000487P^2 - 0,00136CP$$



### Resolución Lanosterol-Colesterol

$$R = 0,935 - 0,0282P + 0,01090C^2 + 0,000284P^2 - 0,002448CP$$

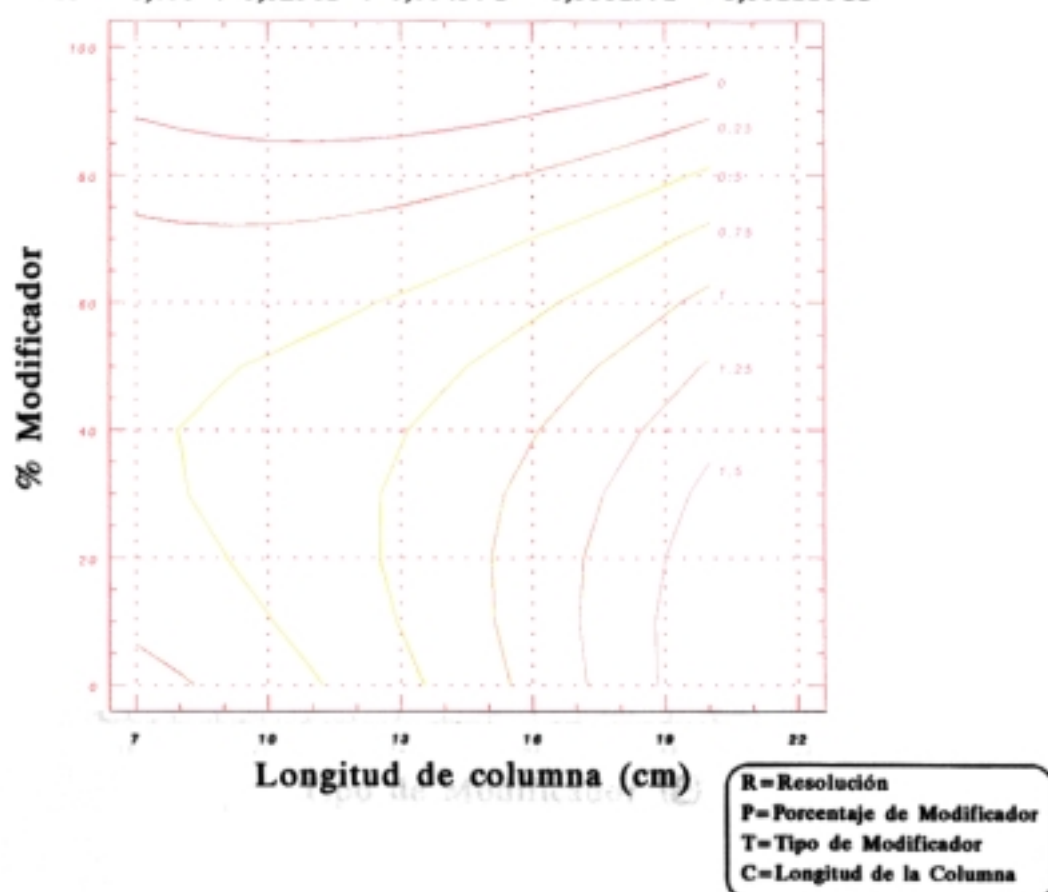


*h*

**Figuras 3.3.1.1(g-p). Influencia del modificador y la longitud de la columna en la varación de la resolución.**

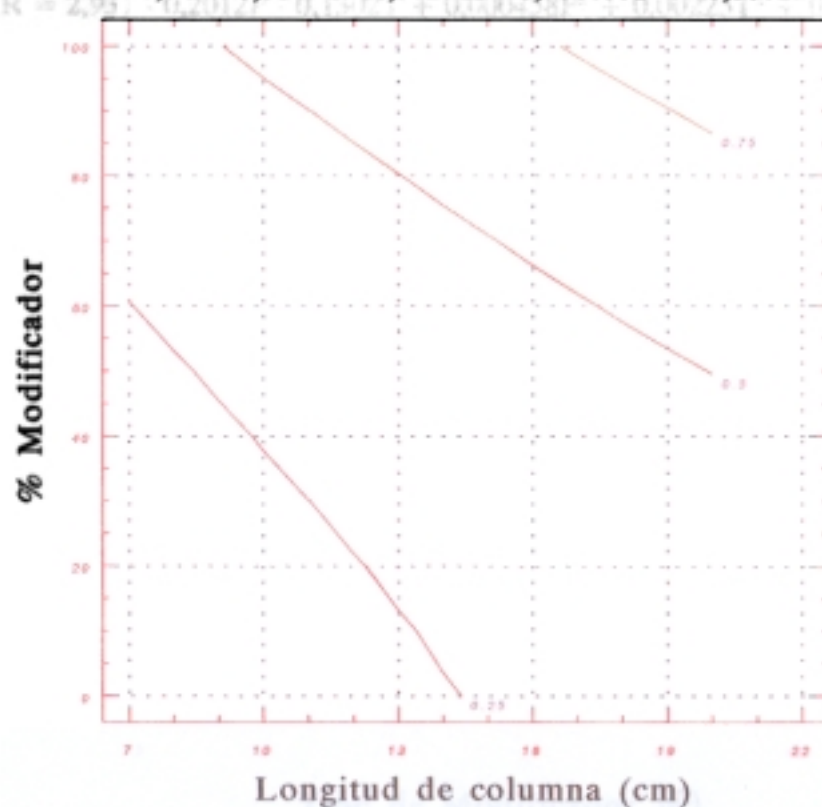
### Resolución Fucoesterol-Colesterol

$$R = -0,053 + 0,0238P + 0,00437C^2 - 0,000199P^2 - 0,001116CP$$



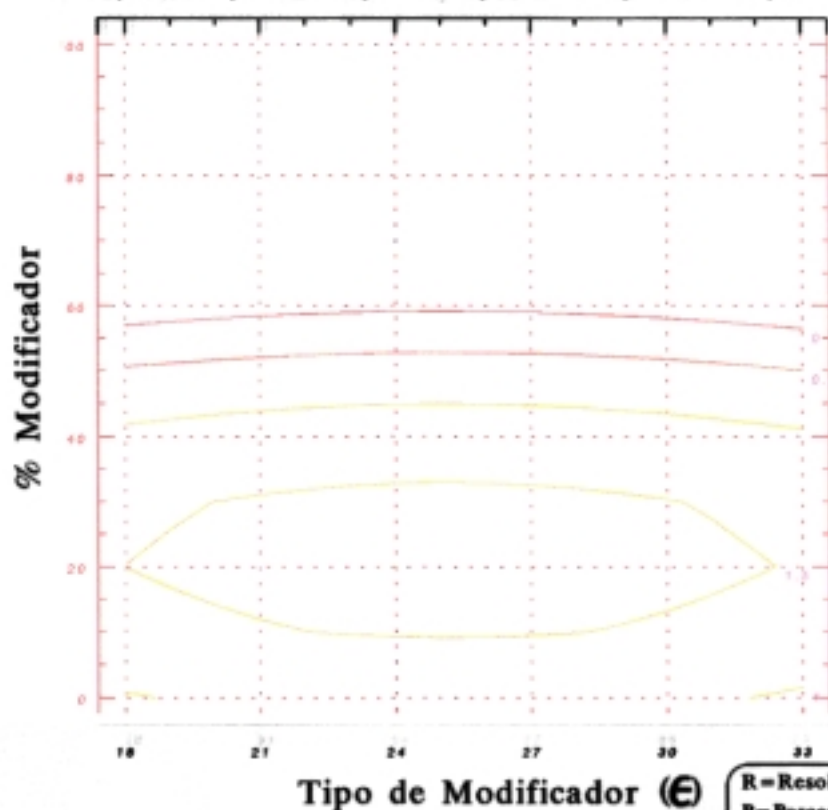
### Resolución Estigmasterol-Campesterol

$$R = 0,099 - 0,0105C - 0,00231P - 0,000033P^2 + 0,000227CP$$



### Resolución Desmosterol-Ergosterol

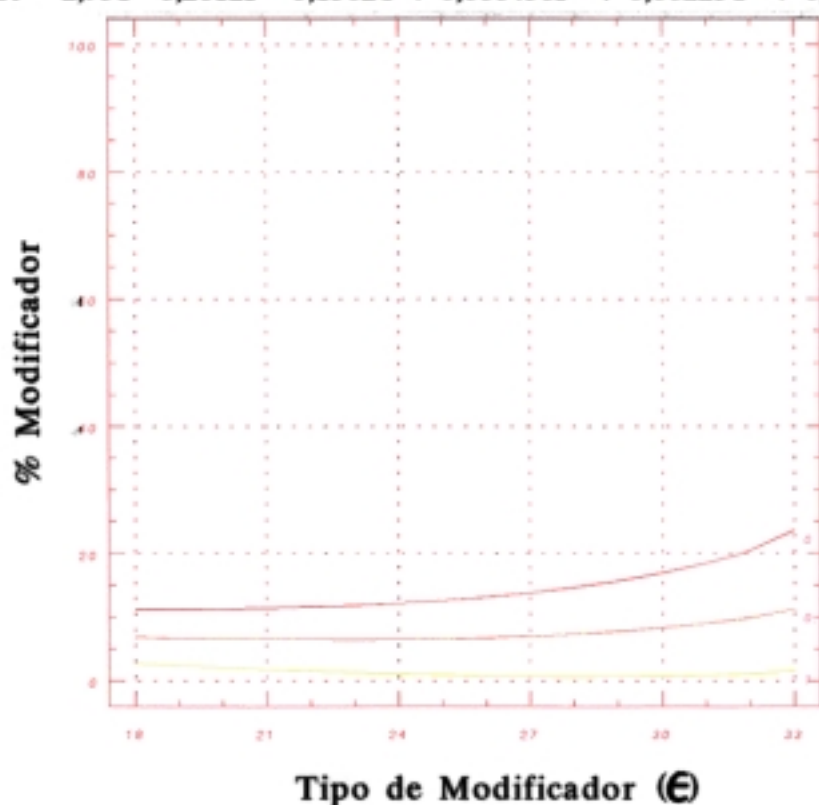
$$R = -1,047 + 0,050P + 0,174T - 0,0012P^2 - 0,0035T^2 - 0,000022PT$$



*k*

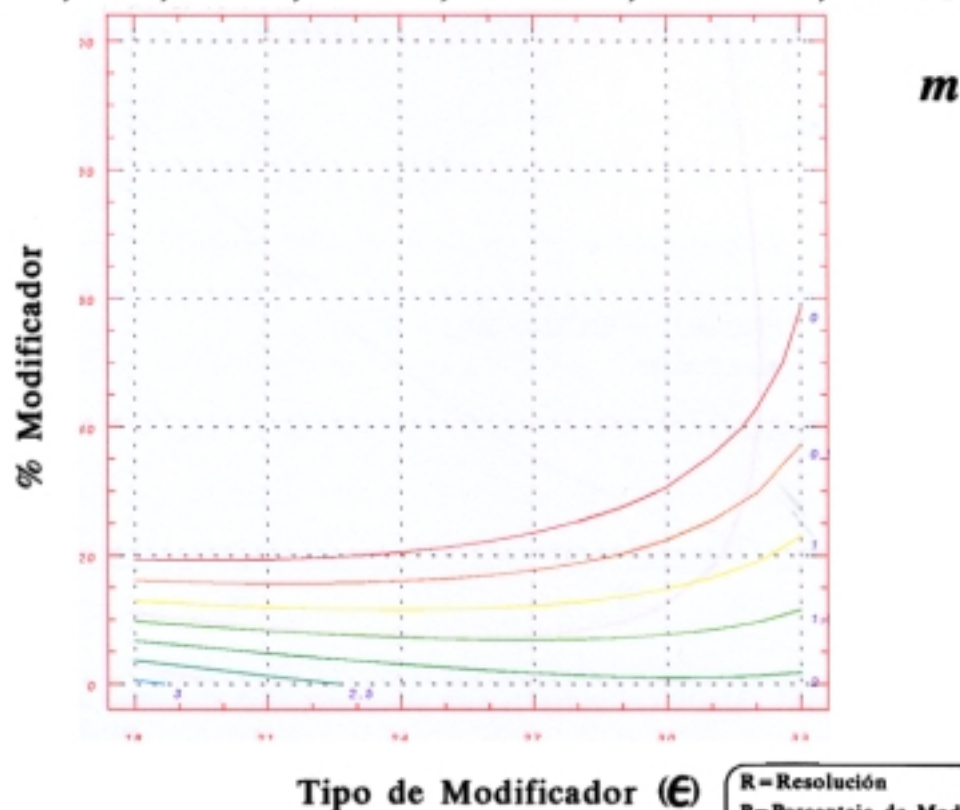
### Resolución Lanosterol-Fucoesterol

$$R = 2,931 - 0,2012P - 0,1302T + 0,000458P^2 + 0,00225T^2 + 0,00437PT$$



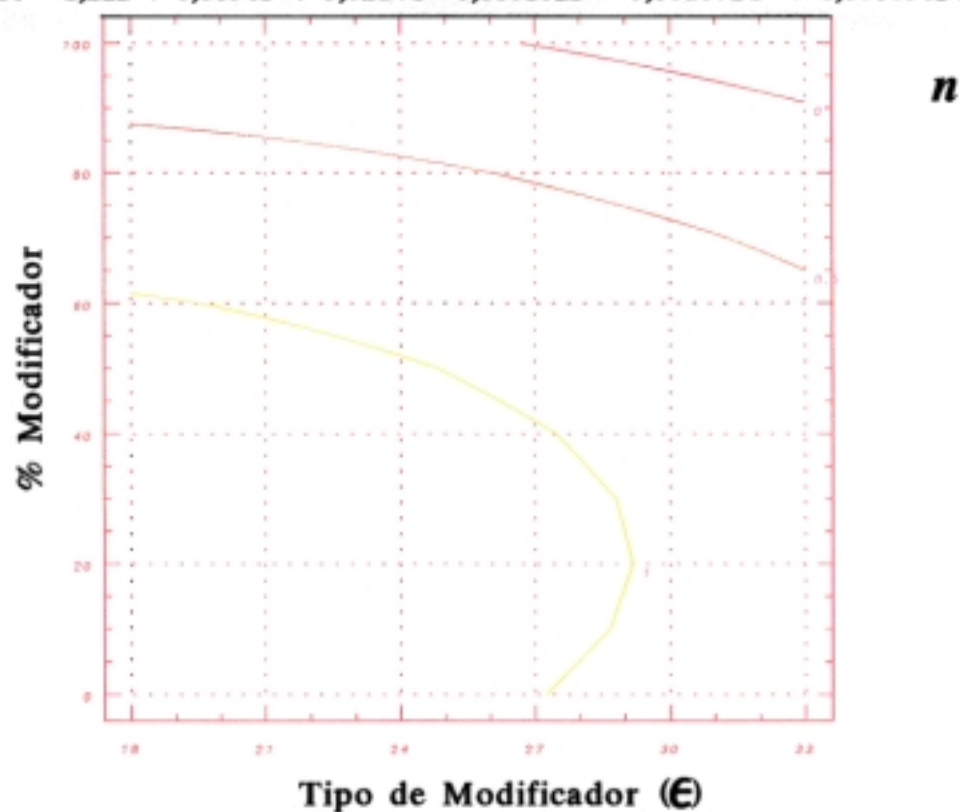
### Resolución Lanosterol-Colesterol

$$R = 7,965 - 0,3007P - 0,3808T + 0,000334P^2 + 0,006149T^2 + 0,007431PT$$



### Resolución Fucosterol-Colesterol

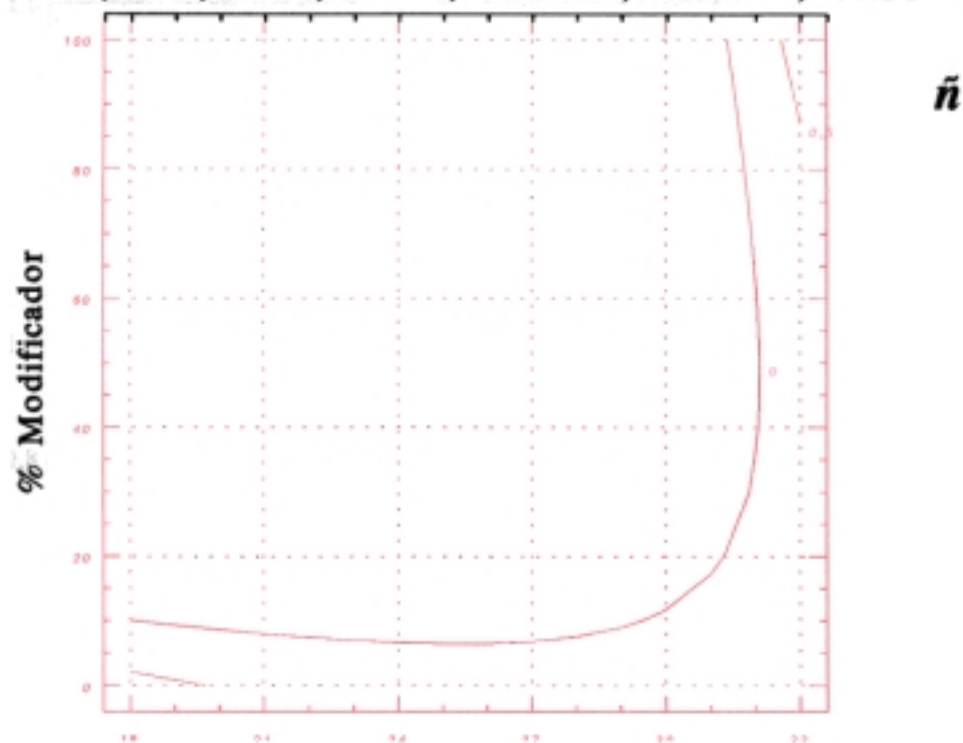
$$R = 1,212 + 0,0056P + 0,0214T - 0,000172P^2 - 0,001071T^2 + 0,000056PT$$





## Resolución Estigmasterol-Campesterol

$$R = 3,525 - 0,132P - 0,235T + 0,00010P^2 + 0,00420T^2 + 0,00380PT$$



Tipo de Modificador (E)

R=Resolución

P=Porcentaje de Modificador

T=Tipo de Modificador

C=Longitud de la Columna

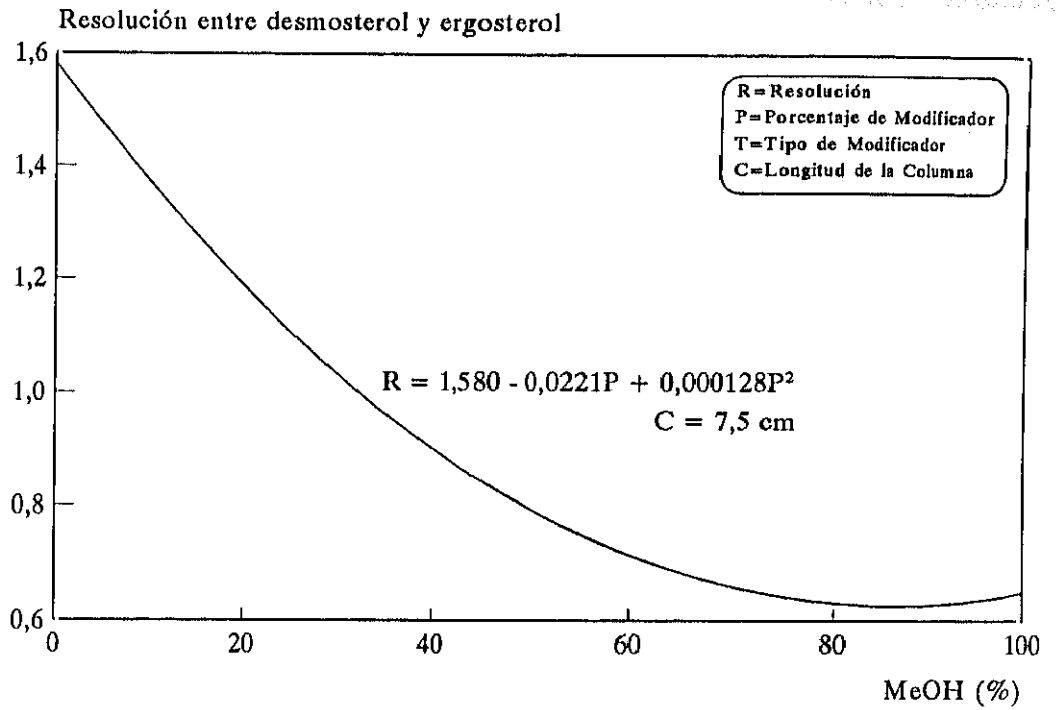


Figura 3.3.1.1o. Influencia de la proporción de metanol en la variación de la resolución. Columna de 7,5 cm.

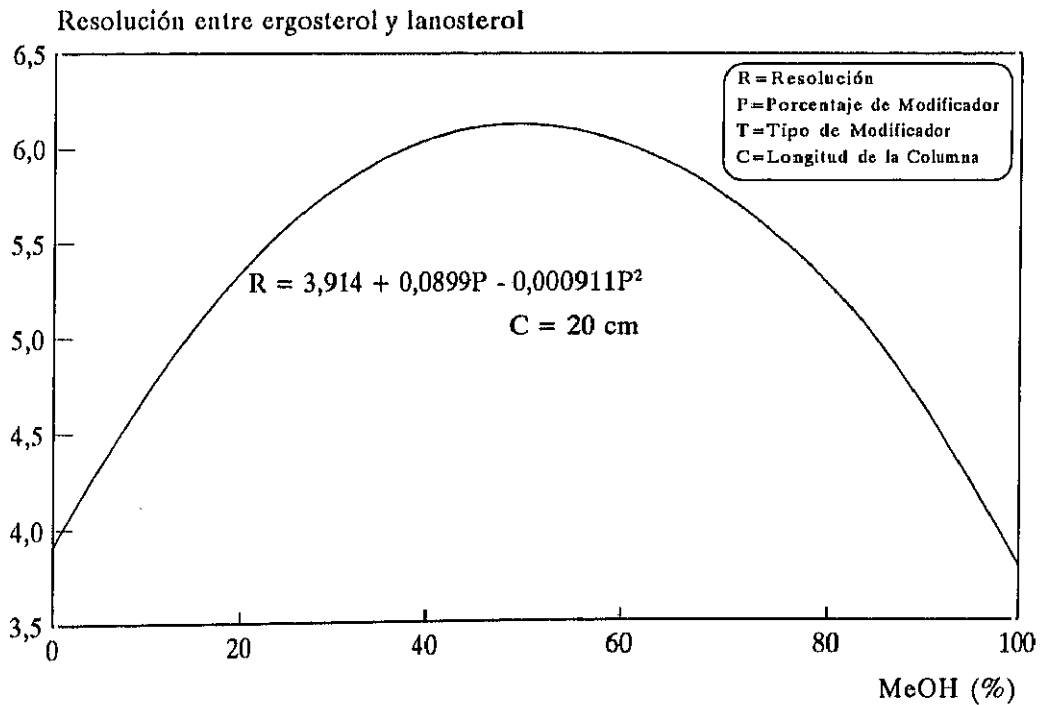


Figura 3.3.1.1p. Influencia de la proporción de metanol en la variación de la resolución. Columna de 20 cm.

Los resultados muestran, en general, que, como era de esperar, se consigue una mejora de la resolución al disminuir el tamaño de partícula del relleno, al aumentar la longitud de la columna para aquellas de igual tamaño de partícula, y al aumentar la polaridad. Estos resultados concluyeron que para conseguir una mejor separación de los patrones del estudio se debía utilizar la columna de 20 cm y 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula con metanol como modificador en la fase móvil. Respecto al porcentaje de metanol hay que decir que para los pares críticos que eluían en primer lugar la resolución mejoraba con bajos porcentajes, sin embargo, para el par estigmasterol-campesterol (el que sufría una mayor retención) la resolución aumentaba con el porcentaje de modificador, hecho que se explica porque el aumento de la anchura de los picos en la base era contrarrestado por el empleo de más cantidad de metanol. Estas últimas conclusiones hicieron aconsejable el empleo de gradiente de polaridad. La figura 3.3.1.1q muestra un cromatograma obtenido utilizando la columna de 20 cm de longitud, con metanol, y las estructuras químicas de los patrones utilizados.

#### 3.3.1.2- Elección del gradiente

El gradiente permitió acortar el tiempo de análisis, mejorando la eficacia al estrechar los picos sin perder resolución.

Se obtuvieron las ecuaciones correspondientes a la variación del factor de capacidad con el porcentaje inicial de metanol y con la velocidad de gradiente:

- Desmosterol:  $\log k' = 1,850 - 0,01498 \cdot G$ ;  
 $\log k' = 1,775 - 0,00496 \cdot I$ ;
- Ergosterol:  $\log k' = 1,859 - 0,01487 \cdot G$ ;  
 $\log k' = 1,784 - 0,00485 \cdot I$ ;

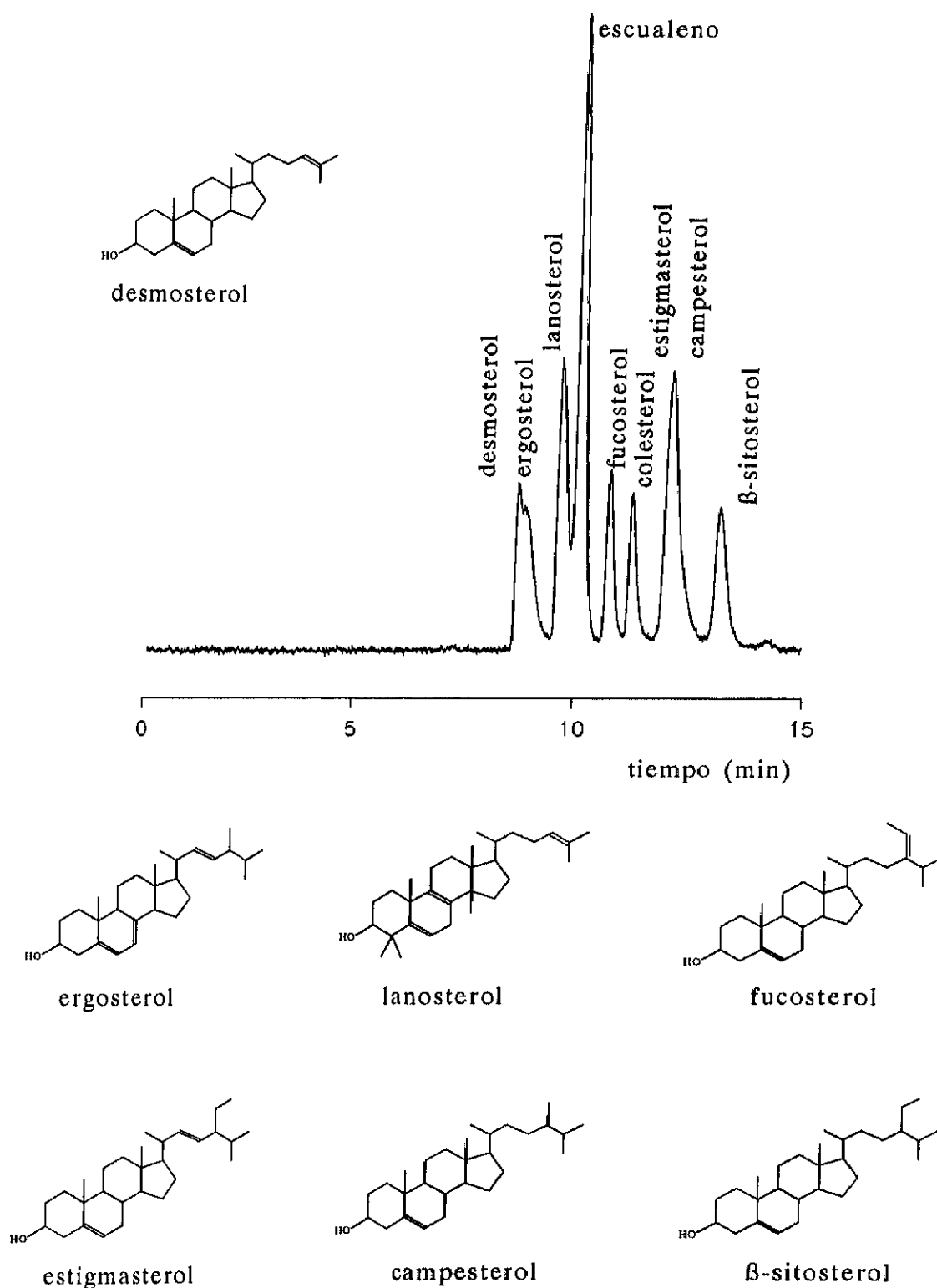


Figura 3.3.1.1q. Cromatograma y estructuras moleculares de los esteroides utilizados.

- Lanosterol:	$\log k' = 1,889 - 0,01218 \cdot G;$ $\log k' = 1,828 - 0,00354 \cdot I;$
- Fucosterol:	$\log k' = 1,953 - 0,01800 \cdot G;$ $\log k' = 1,863 - 0,00441 \cdot I;$
- Colesterol:	$\log k' = 1,978 - 0,01944 \cdot G;$ $\log k' = 1,881 - 0,00435 \cdot I;$
- Campesterol:	$\log k' = 2,013 - 0,02018 \cdot G;$ $\log k' = 1,912 - 0,00406 \cdot I;$
- $\beta$ -Sitosterol:	$\log k' = 2,056 - 0,02182 \cdot G;$ $\log k' = 1,946 - 0,00386 \cdot I;$
- Escualeno:	$\log k' = 1,893 - 0,00706 \cdot G;$ $\log k' = 1,858 - 0,00129 \cdot I;$

donde G es el gradiente en %/min,

I es el metanol inicial en %.

Las figuras 3.3.1.2 a y b muestran las representaciones gráficas de las ecuaciones arriba indicadas. Se observó que el comportamiento del escualeno frente al gradiente era copletamente distinto al del resto de componentes, produciéndose pocas variaciones del tiempo de retención, es decir, que el gradiente de polaridad no parece afectar al tiempo de elución del escualeno. Estas diferencias pueden ser debidas a la distinta estructura molecular del escualeno respecto a los otros compuestos. De esta forma, y en el rango estudiado, la retención relativa del escualeno mejoraba con unos compuestos a la vez que empeoraba con otros. En el caso de haber un porcentaje inicial de metanol del 0% la elución del escualeno se produjo entre la del lanosterol y fucosterol. Si el % inicial era de un 40% la elución del escualeno, apenas variada, se produjo en el último lugar, tras la elución del  $\beta$ -sitosterol. El resto de componentes sufrió una disminución del tiempo de retención al aumentar el gradiente, no habiendo diferencias entre ellos, con poca afectación de la selectividad ( $\alpha$ ) en la mayoría de los casos y para ambas experiencias; la

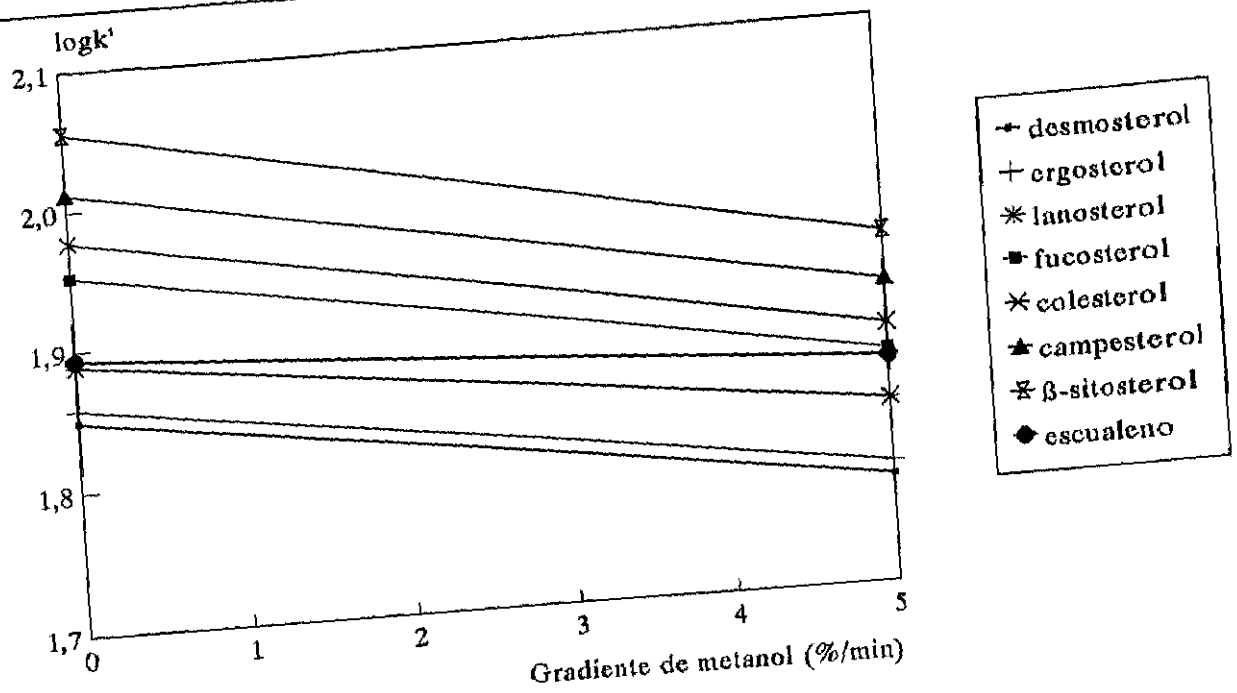


Figura 3.3.1.2a. Influencia del gradiente en la variación de  $k'$ .  
% inicial = 0.

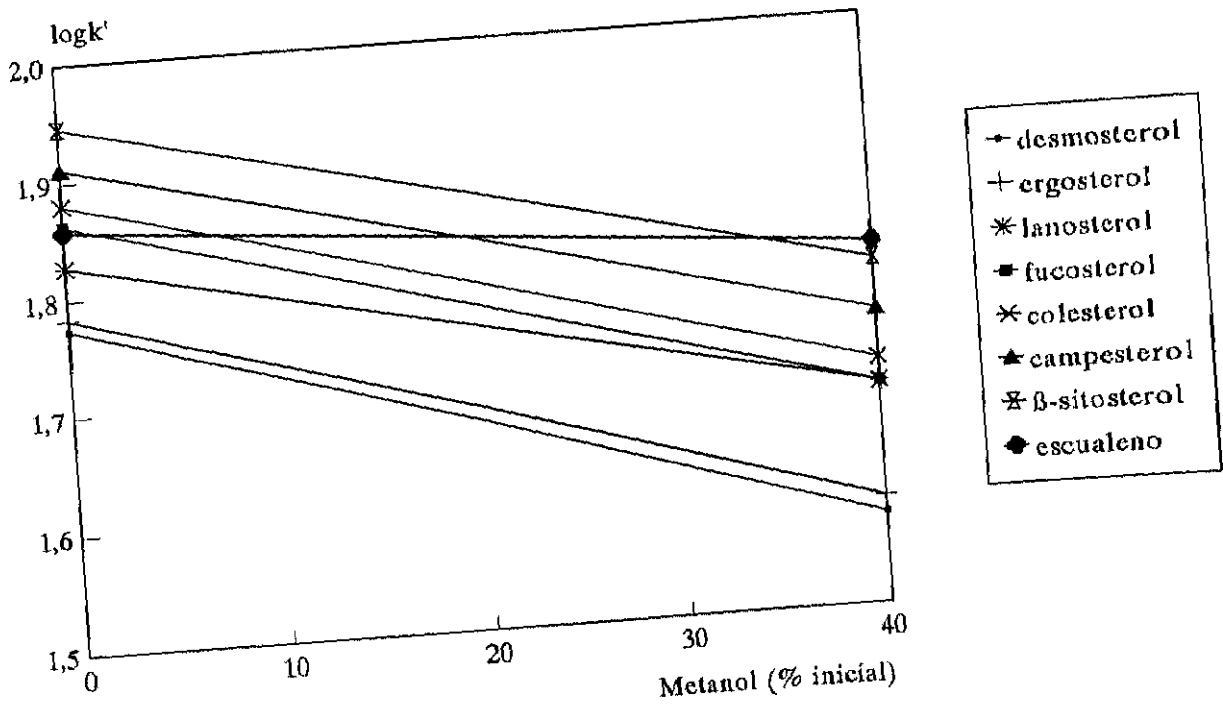


Figura 3.3.1.2b. Influencia del porcentaje inicial de metanol en la variación de  $k'$ .

excepción fue el par lanosterol-fucoesterol en el que la selectividad toma valores próximos a 1 cuando las condiciones fueron de un 40% de metanol inicial. Los pares críticos estudiados fueron desmosterol-ergosterol y campesterol- $\beta$ -sitosterol para la obtención de los valores de resolución, en el primero de ellos el valor de  $\alpha$  fue bajo en todas las condiciones, en el segundo caso fue el ensanchamiento de los picos lo que llevó a esa determinación. Los gradientes entre 2 y 4%/min consiguen mayores separaciones entre el escualeno y los esteroides lanosterol y fucoesterol.

Posteriormente se procedió al estudio de la influencia de los dos factores cromatográficos en la resolución de los pares críticos. Las figuras 3.3.1.2 c y d muestran las ecuaciones obtenidas y sus representaciones gráficas.

La resolución entre el desmosterol y el ergosterol (figura 3.3.1.2c) disminuye de modo importante a medida que el porcentaje inicial de modificador aumenta y en menor medida cuando disminuye. Para la mejor separación de estos compuestos conviene utilizar porcentajes iniciales bajos y gradientes de 3 - 8%/min. La mejor resolución entre el campesterol y el  $\beta$ -sitosterol se consigue para porcentajes iniciales muy bajos (0 - 3 %) y gradientes bajos; la resolución con un gradiente del 3%/min y acetonitrilo inicial al 100% conduce a una resolución cercana a 1.

Concluyendo: se observa que en el rango estudiado se obtenía una mejor resolución con un bajo porcentaje inicial de metanol y gradientes medios. Así pues, se decidió que el gradiente fuera de 3%/min partiendo de 0% de metanol, de esta forma, también se conseguía que el escualeno eluyera entre el lanosterol y el fucoesterol consiguiéndose la mejor separación posible del escualeno con cualquiera de los esteroides estudiados. Respecto a los análisis de muestras de destilado de la desodorización de aceites de oliva o girasol se consiguió que escualeno eluyera en primer lugar, sin producirse solapamientos con el estigmasterol, campesterol ni  $\beta$ -sitosterol (compuestos existentes en el destilado).

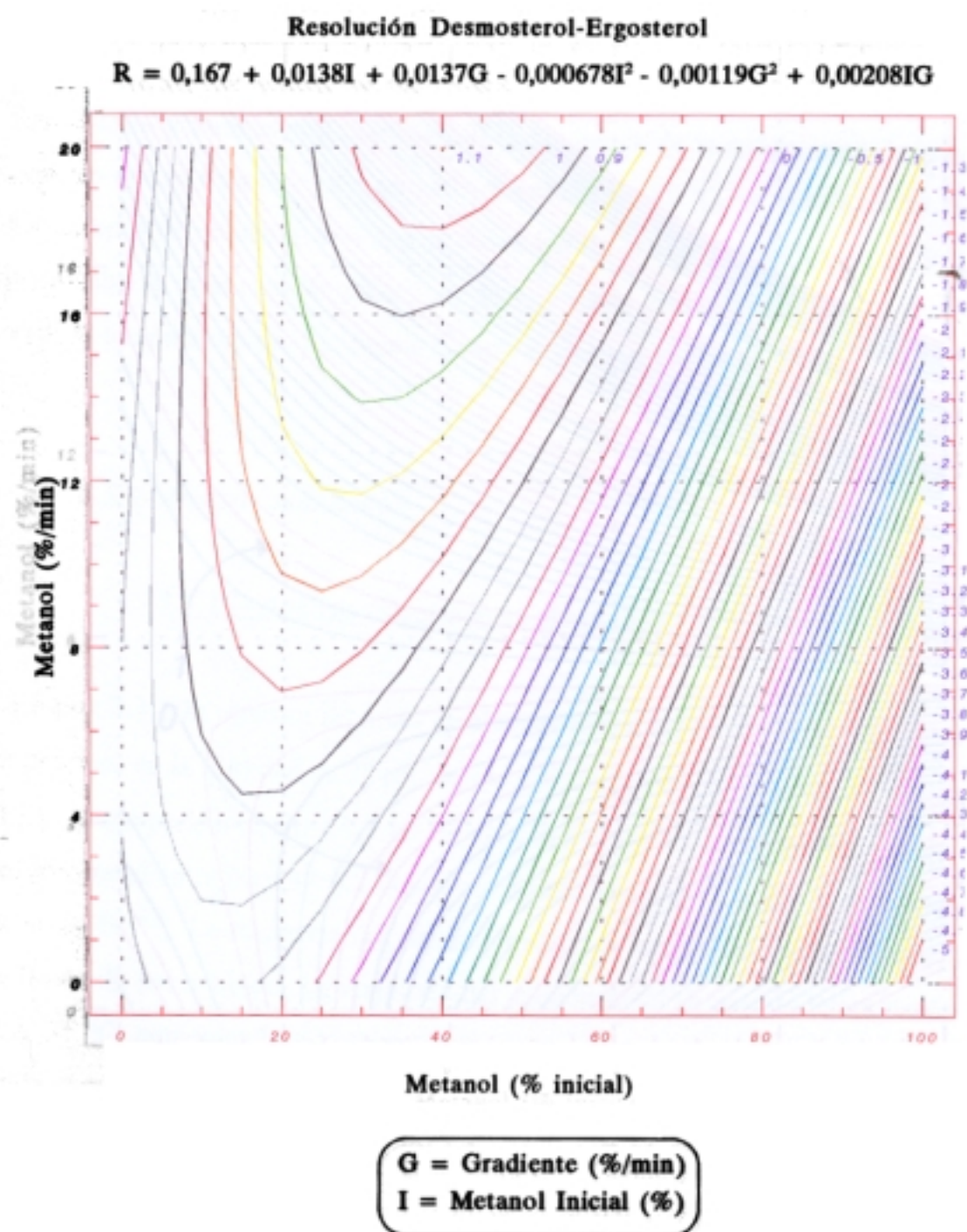


Figura 3.3.1.2c. Influencia del gradiente en la variación de la resolución.



### Resolución Campesterol- $\beta$ -Sitosterol

$$R = 1,337 + 0,111I - 0,159G - 0,00531I^2 + 0,00450G^2 + 0,00480IG$$

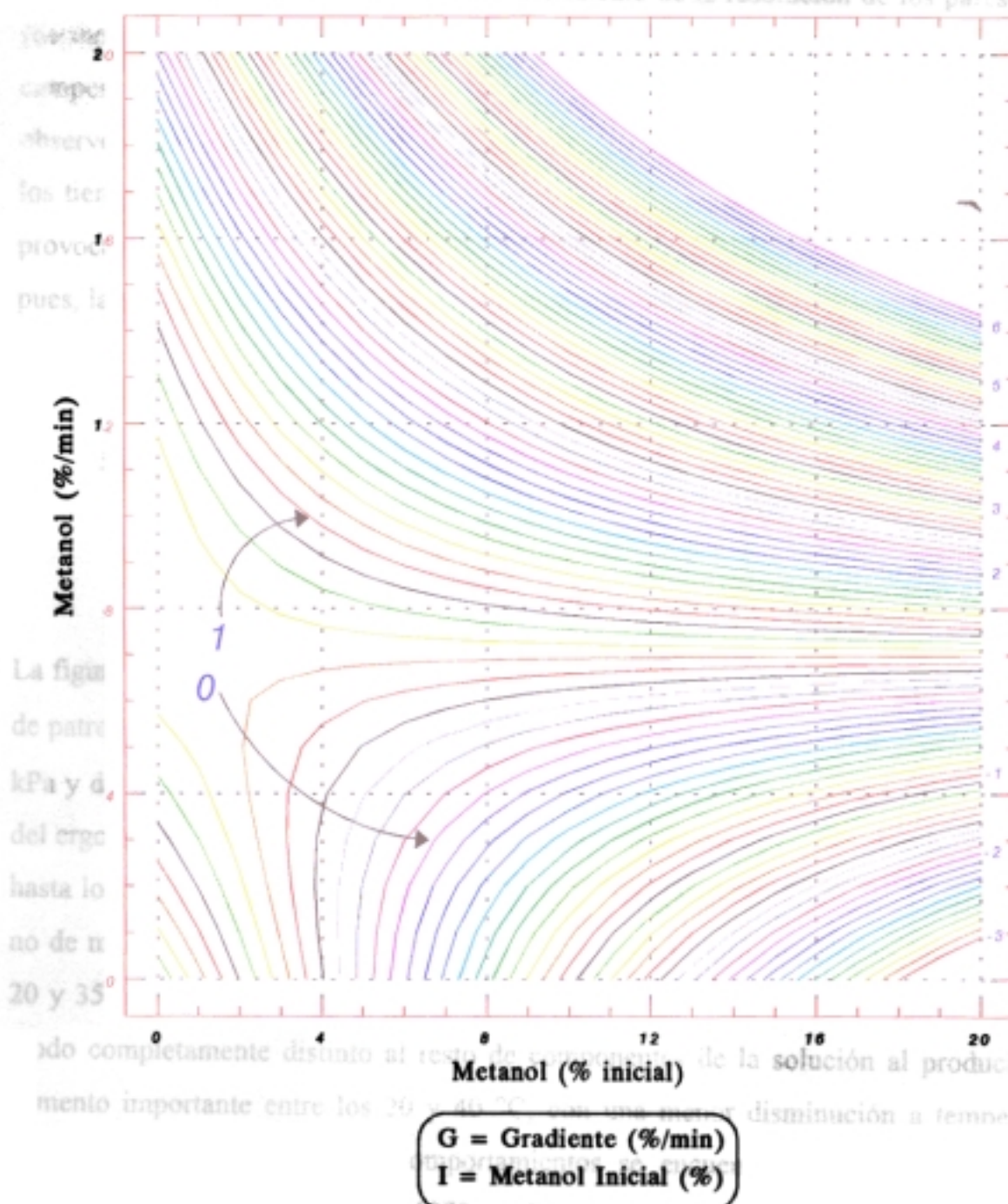


Figura 3.3.1.2d. Influencia del gradiente en la variación de la resolución.

### 3.3.1.3- Elección de la temperatura de la columna

La figura 3.3.1.3 muestra los resultados del cálculo de la resolución de los pares críticos (desmosterol-lanosterol, lanosterol-fucosterol, fucosterol-colesterol, colesterol-campesterol y campesterol- $\beta$ -sitosterol) dependiendo de la temperatura de la columna. Se observó que la temperatura más adecuada era la de 45 °C, ya que la de 55 °C disminuía los tiempos de retención con apenas variación de la anchura de los picos, y la de 35 °C provocaba la aparición de colas, por lo que había también pérdida de resolución. Así pues, la temperatura de la columna durante el análisis se fijó en 45 °C.

### *3.3.2- Análisis cuantitativo*

#### 3.3.2.1- Análisis estadístico en el estudio de la respuesta del detector

La figura 3.3.2.1a muestra las áreas resultantes obtenidas tras la inyección de la solución de patrones en la cantidad de 20  $\mu$ g, siendo las condiciones de presión del detector de 172 kPa y de temperatura entre 20 y 60 °C. Se observa un descenso marcado de la respuesta del ergosterol entre 20 y 45 °C, existiendo apenas variación a partir de esta temperatura y hasta los 60 °C. La respuesta del colesterol sufre un comportamiento semejante, si bien, no de modo tan acusado. La respuesta del estigmasterol desciende ligeramente entre los 20 y 35 °C, aumentando a temperaturas superiores. La respuesta del escualeno varía de modo completamente distinto al resto de componentes de la solución al producirse un aumento importante entre los 20 y 40 °C, con una menor disminución a temperaturas mayores. Las bases de estos comportamientos se encuentran, principalmente, en la volatilidad (según Charlesworth, 1978, en la temperatura a la que la presión de vapor es de 1 mm Hg, o bien, el punto de fusión en su defecto) de cada uno de los compuestos, reunidos en la tabla 3.3.2.1 junto con su correspondiente punto de fusión.

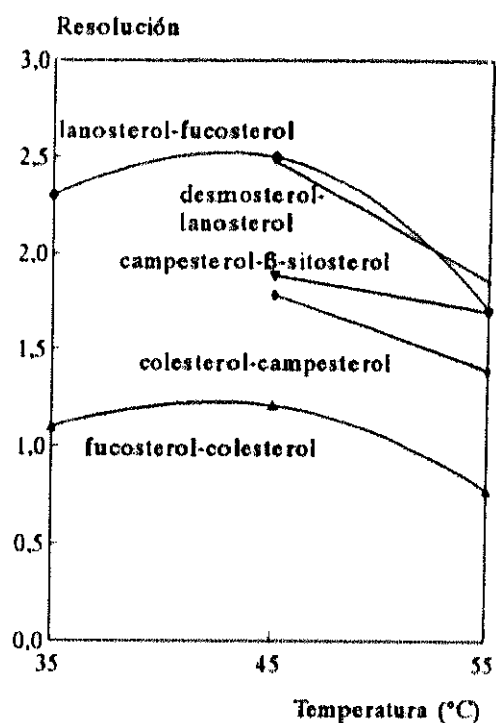


Figura 3.3.1.3. Influencia de la temperatura de la columna.

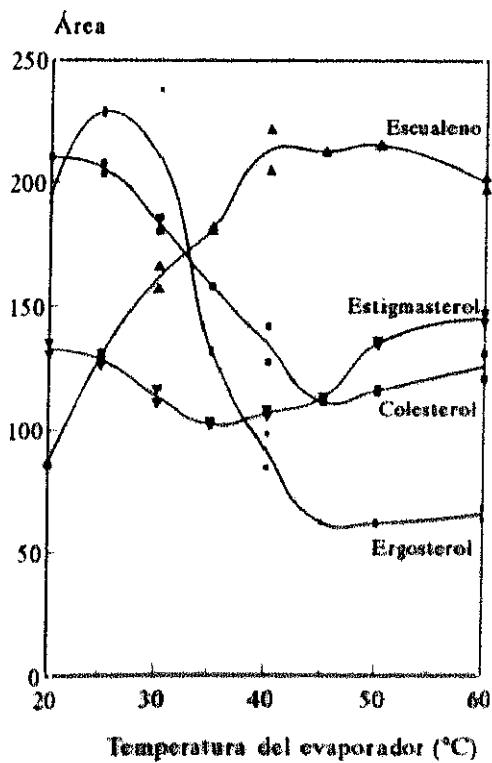


Figura 3.3.2.1a. Influencia de la temperatura en el detector sobre el área de los patrones.

**Tabla 3.3.2.1. Puntos de fusión de los componentes de la disolución.**

	Pto. fusión (°C)
<b>Ergosterol</b>	168
<b>Colesterol</b>	148
<b>Estigmasterol</b>	164
<b>Escualeno</b>	<-20

La disminución de la respuesta que ocurre en los casos del ergosterol, colesterol y estigmasterol en el rango de temperaturas bajas (25 - 45 °C para el ergosterol, 20 - 45 °C para el colesterol, 20 - 35 °C para el estigmasterol) se debe a la disminución del tamaño de las partículas sólidas en el evaporador, ya que aumenta la volatilización al aumentar la temperatura. A temperaturas superiores (> 45 °C para el ergosterol y colesterol, > 35 °C para el estigmasterol) se produce un aumento del tamaño de las partículas debido a la dilatación de éstas, siendo entonces éste un factor dominante sobre la volatilización y aumentando la cantidad de luz desviada. Este mismo último comportamiento ocurre en el caso del escualeno entre 20 y 40 °C, es decir, el aumento del tamaño de las partículas por la dilatación que sufren al aumentar la temperatura, por encontrarse en estado líquido a estas temperaturas, ya que la dilatación que se produce en estado líquido es mucho más importante que la producida en los estados sólidos. Sin embargo, a temperaturas por encima de ésta última (40 °C) comienza a apreciarse el efecto de la volatilización, habiendo un leve descenso de la respuesta al acercarse a temperaturas en el evaporador cada vez mayores. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por otros autores y por los obtenidos mediante razonamientos empíricos (Charlesworth, 1978), basándose las explicaciones dadas en las observaciones de estos otros autores.

Una segunda experiencia, que se dedicó al estudio de la presión del nebulizador y a ampliar el rango de temperaturas hasta los 96 °C ofreció los resultados que se muestran en las figuras 3.3.2.1 (b-e). Se observa que las nuevas temperaturas del estudio de 80 y, especialmente, 96 °C consiguen un gran aumento de la volatilización de todos los solutos

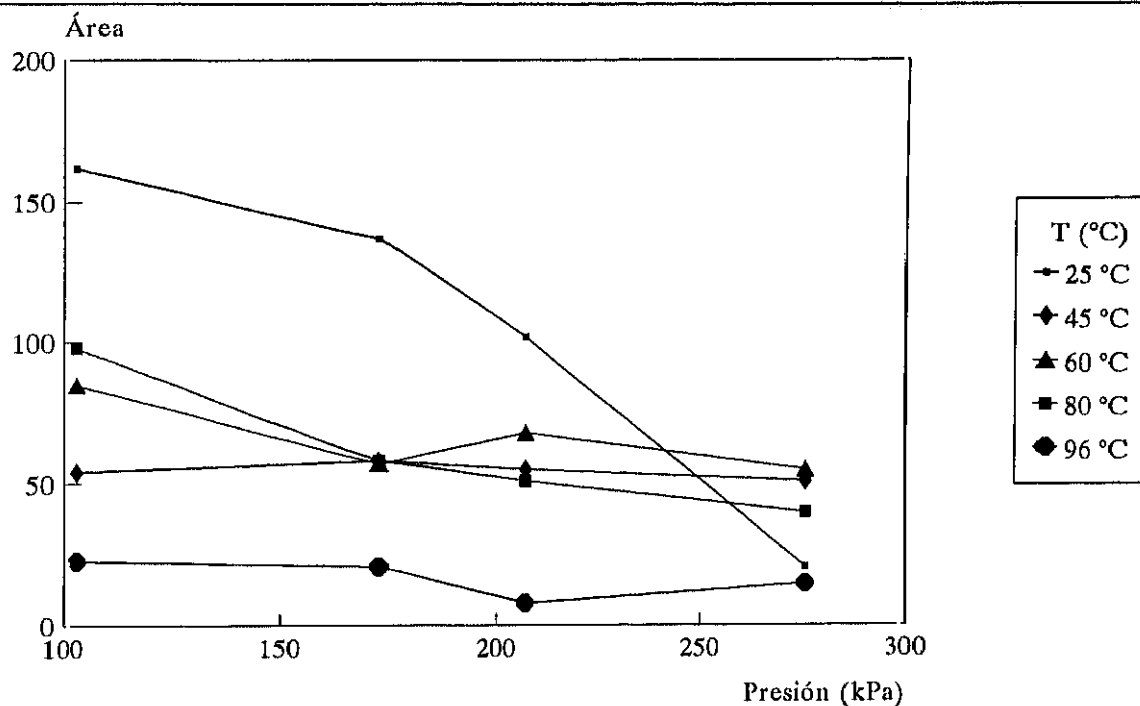


Figura 3.3.2.1b. Influencia de la presión y temperatura del evaporador en la respuesta del ergosterol

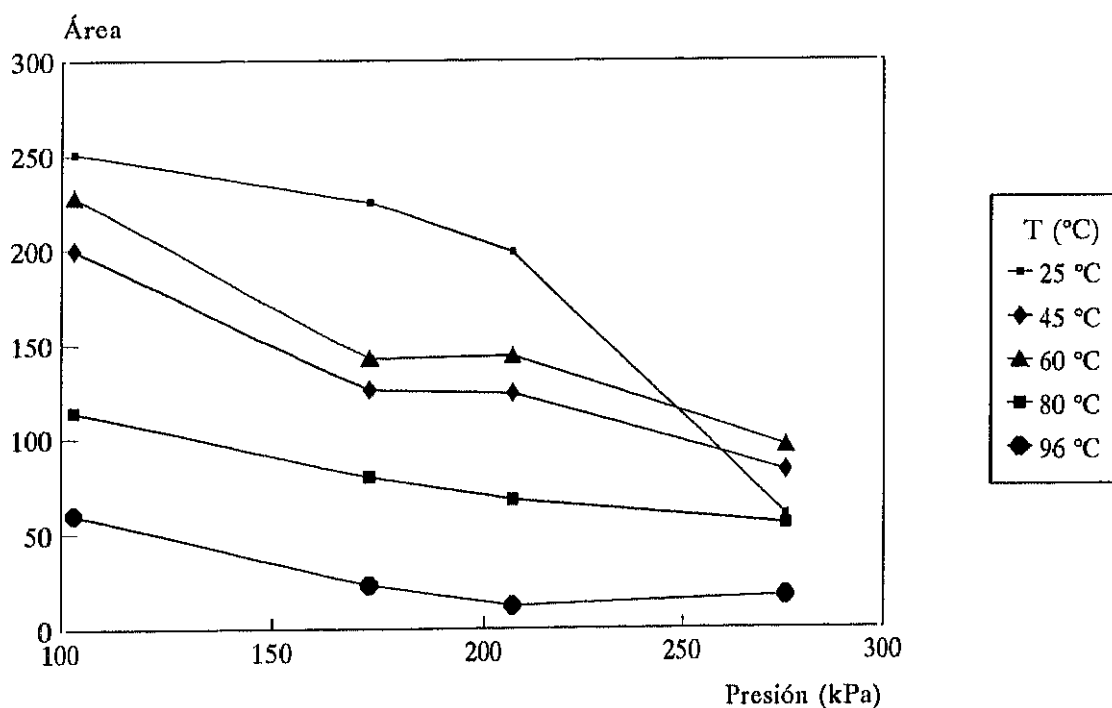


Figura 3.3.2.1c. Influencia de la presión y temperatura del evaporador en la respuesta del colesterol

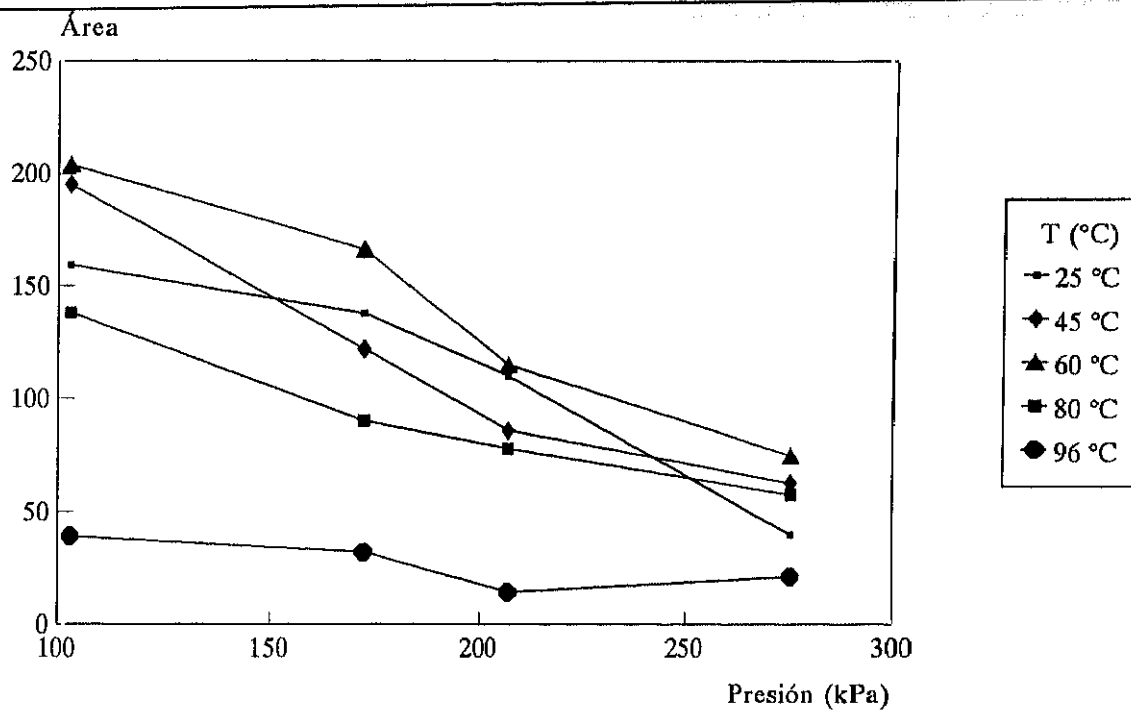


Figura 3.3.2.1d. Influencia de la presión y temperatura del evaporador en la respuesta del estigmasterol.

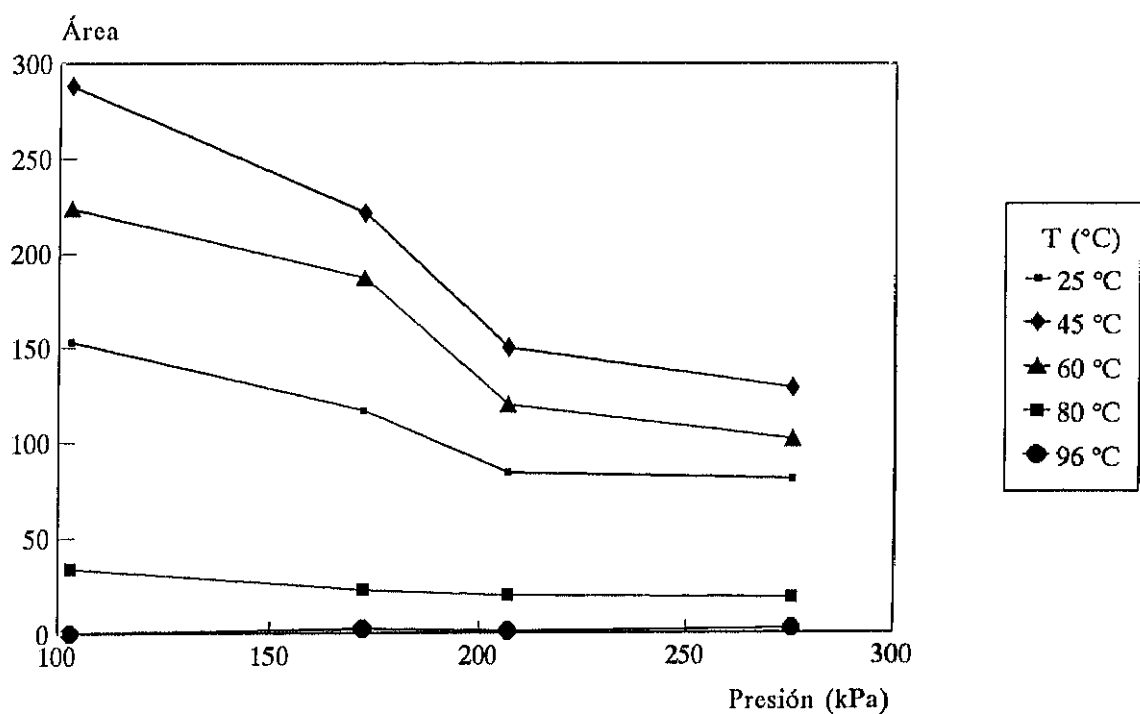


Figura 3.3.2.1e. Influencia de la presión y temperatura del evaporador en la respuesta del escualeno.

posteriormente a la evaporación de la fase móvil, produciendo una gran disminución de la respuesta. En el caso del escualeno, y debido a su mayor volatilidad, la respuesta es extremadamente baja, haciéndose casi indetectable a 96 °C (figura 3.3.2.1e).

El aumento de la presión a temperatura constante conduce a la formación de partículas de menor tamaño, con la consecuente pérdida de respuesta. Charlesworth (1978) da explicación a este último comportamiento: la disminución del tamaño de partícula supone que la relación superficie/volumen aumenta, además de que se produce un mayor número de partículas, por tanto, la respuesta aumentaría. Sin embargo, para partículas muy pequeñas es muy importante el efecto de la pérdida de luz reflejada y refractada, que son los mecanismos más importantes en el fenómeno de la dispersión de la luz, surgiendo otros fenómenos (dispersión de Raleigh y dispersión de Mie) que producen luz dispersada de menor intensidad. De este modo, el ergosterol, colesterol y estigmasterol, sólidos a temperatura ambiente, presentan dos mínimos y dos máximos en los perfiles de respuesta, el primero de ellos se produce a las menores temperaturas cuando se produce un aumento de la temperatura del evaporador y se debe al efecto de la disminución del tamaño de partícula estando en estado sólido, su localización varía en función del compuesto en cuestión y de la presión utilizada. El segundo mínimo en el perfil de la respuesta se produce a la mayor temperatura del estudio (96 °C), encontrándose la partícula en estado líquido o semisólido. El perfil de respuesta del escualeno sitúa los mínimos en las temperaturas extremas (25 y 96 °C) independientemente de la presión de estudio y encontrándose siempre sus partículas de la nebulización en estado líquido.

La disminución de la presión conduce a la formación de partículas de gran tamaño, con el consiguiente aumento de la respuesta por el favorecimiento de la reflexión y refracción como fenómenos dominantes en el proceso de dispersión de la luz y producen luz de mayor intensidad, por eso la respuesta mayor se alcanza, a temperatura constante, a la presión de estudio más baja (103 kPa) para cualquiera de los cuatro compuestos estudiados (figuras 3.3.2.1b-e).

La variación de la respuesta con la presión del nebulizador y la temperatura del evaporador del detector de masa pudo ser estudiada mediante las ecuaciones que se hallan en las figuras 3.3.2.1(f-i) junto a sus representaciones gráficas y que fueron obtenidas mediante regresión múltiple.

El comportamiento es similar entre ergosterol, colesterol y estigmasterol. Para estos compuestos la máxima respuesta se alcanza a las menores presiones y temperaturas, disminuyendo rápidamente a partir de los 80 °C, siendo poca la influencia de la presión a partir de esta temperatura. El comportamiento diferente del escualeno quedó reflejado en el cálculo de su respuesta, ya que la máxima respuesta de escualeno se consigue también disminuyendo la presión, pero a temperaturas cercanas a 45 °C, en lugar de 25 °C; la respuesta disminuye rápidamente a partir de 70 °C, con casi nula influencia de la presión.

Las condiciones óptimas del detector fueron 30 °C y presión de 137 kPa. De este modo la respuesta de todos los compuestos pudo ser lo más alta posible siendo a la vez semejante entre ellas (1,9 - 1,7). Temperaturas de 25 °C o menores no convinieron para el estudio, ya que, si bien producían altas respuestas, aumentaba mucho el nivel basal de ruido por la difícil eliminación de la fase móvil en el evaporador.

#### 3.3.2.2- Linealidad de respuesta

El estudio de la linealidad de la respuesta en las condiciones del detector no optimizadas (45 °C, 172 kPa) dio lugar a resultados semejantes a los obtenidos por Charlesworth en 1978 en el estudio de compuestos apolares. Se observó la tendencia sigmoideal de la respuesta (figura 3.3.2.2a), existiendo un comportamiento logarítmico para cantidades superiores a 50 µg, lineal en un tramo intermedio desde 6 hasta 25 µg (figura 3.3.2.2b), y exponencial para las cantidades menores en el estudio (figura 3.3.2.2c). Al representar los datos obtenidos sobre un eje doble logarítmico se observó que los resultados seguían la tendencia de una recta, concordando con los resultados anteriores de otros investigadores,



$$R = 3,73 - 0,0038P - 0,121 + 0,00221T - 1,8 \cdot 10^{-6}P^2 - 1,2 \cdot 10^{-5}T^2 + 2,2 \cdot 10^{-5}PT + 1,810 \cdot 10^{-6}P^2T - 9,7 \cdot 10^{-6}PT^2$$

P = Presión (psi)  
T = Temperatura (°C)  
R = Respuesta  
= log(A)/log(μg)

Respuesta del colesterol

$$R = 3,26 - 0,017P - 0,071T + 0,00017P^2 + 0,0015T^2 - 0,97 \cdot 10^{-5}T^3 + 0,95 \cdot 10^{-5}PT - 0,32 \cdot 10^{-5}P^2T + 0,12 \cdot 10^{-4}PT^2$$

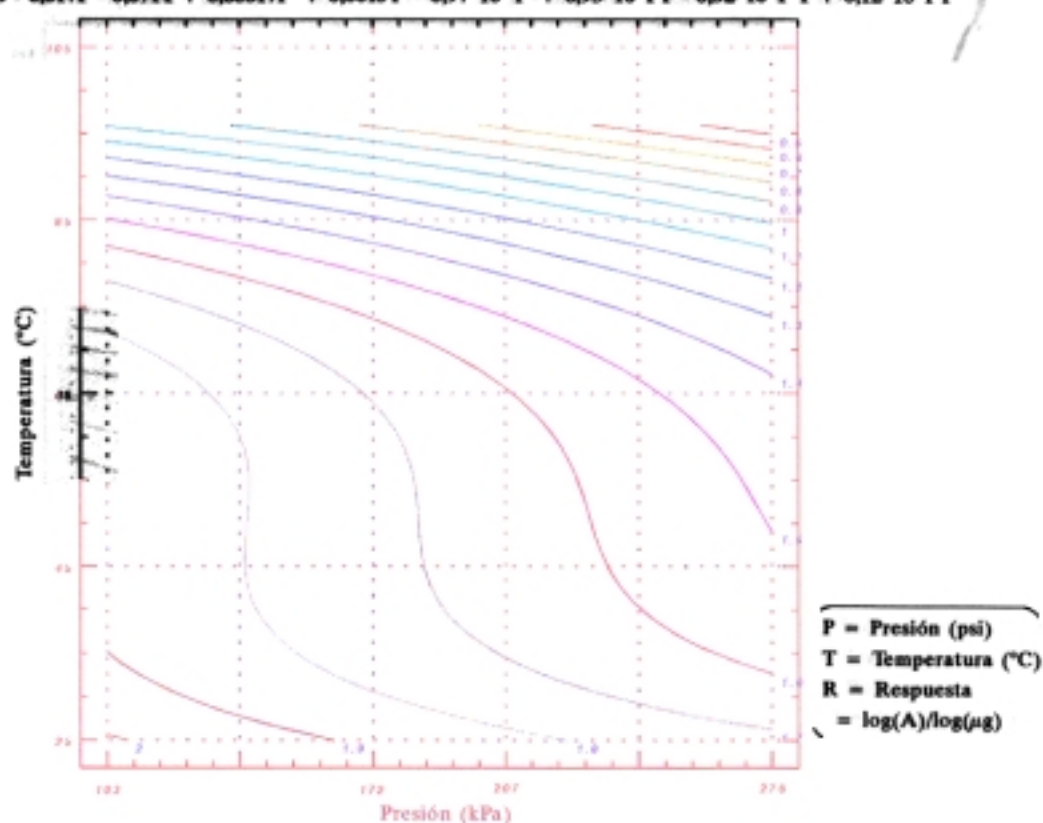


Figura 3.3.2.1g. Influencia de la presión y la temperatura del detector en la respuesta del colesterol

### Respuesta del estigmasterol

$$R = 1,85 - 0,048P - 0,026T - 0,0012P^2 + 0,00092T^2 - 0,69 \cdot 10^{-6}T^3 - 0,0011PT + 1,7 \cdot 10^{-5}P^2T - 1,53 \cdot 10^{-6}PT^2$$

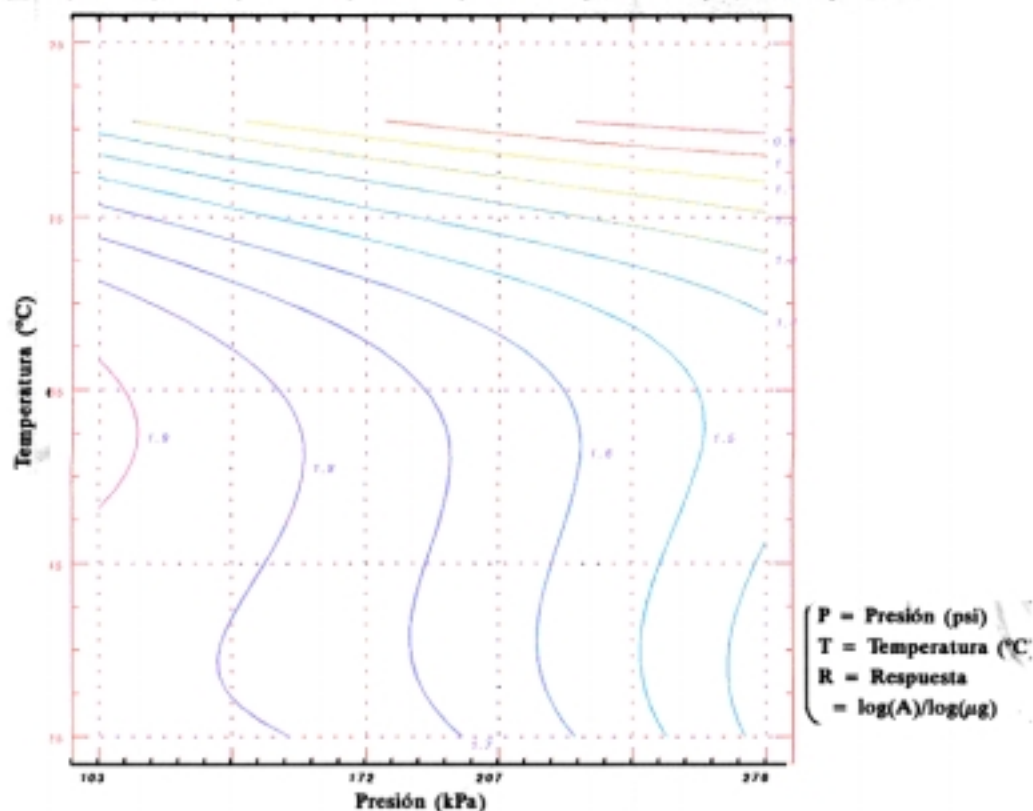


Figura 3.3.2.1h. Influencia de la presión y la temperatura del detector en la respuesta del estigmasterol

### Respuesta del escualeno

$$R = -0,021 + 0,025P + 0,10T - 0,00042P^2 - 0,0011T^2 + 0,75 \cdot 10^{-6}T^3 - 0,0014PT + 0,82 \cdot 10^{-5}P^2T + 0,99 \cdot 10^{-6}PT^2$$

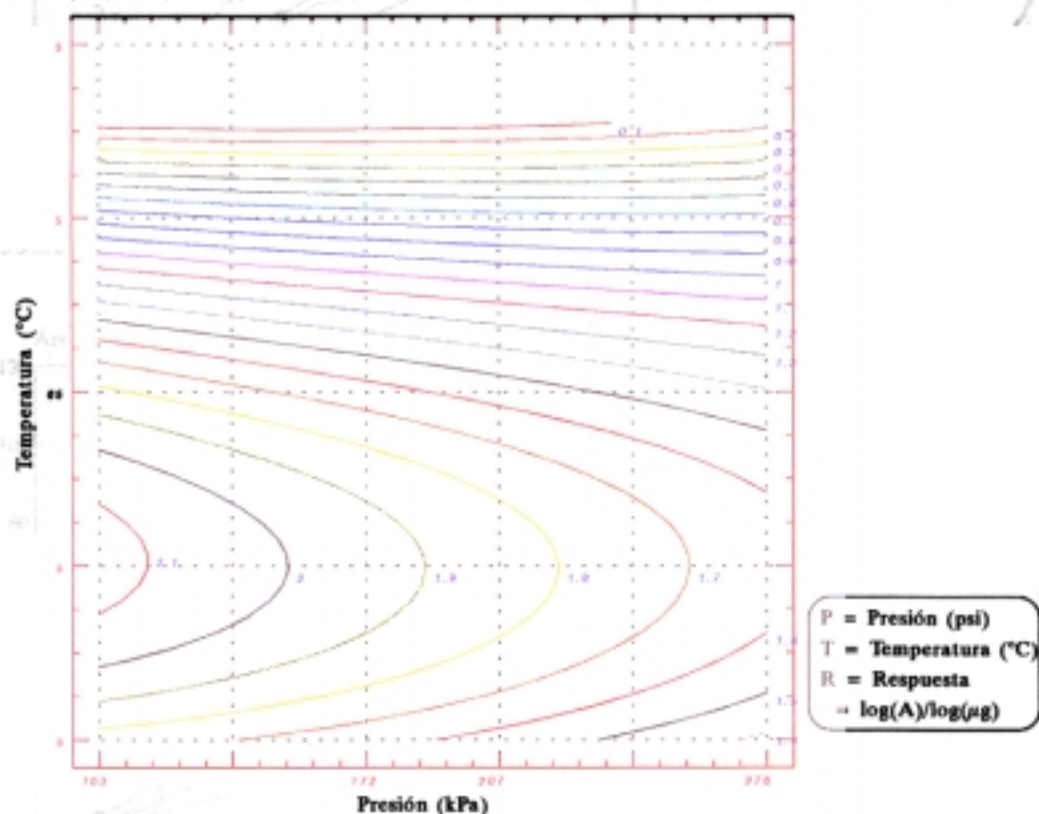


Figura 3.3.2.1i. Influencia de la presión y la temperatura del detector en la respuesta del escualeno

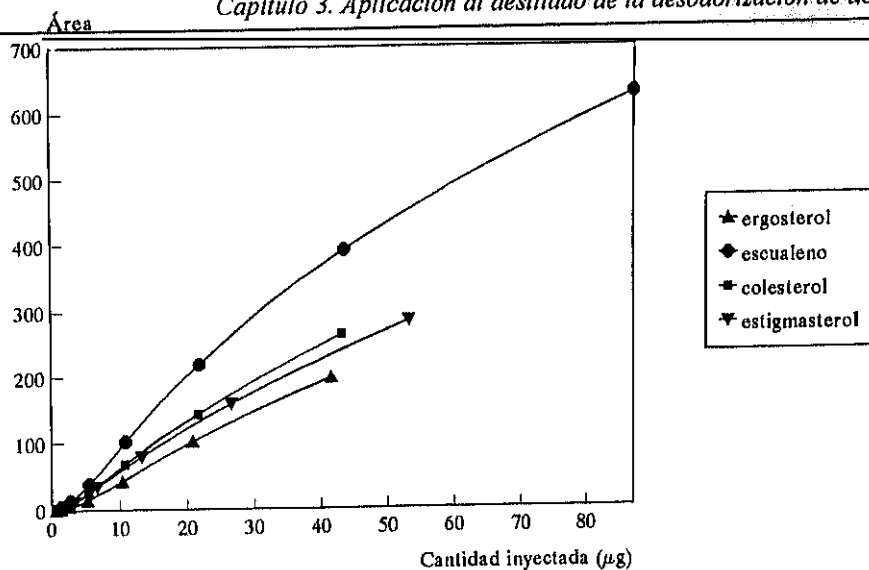


Figura 3.3.2.2a. Linealidad de respuesta. Condiciones del detector: 45 °C, 172 kPa.

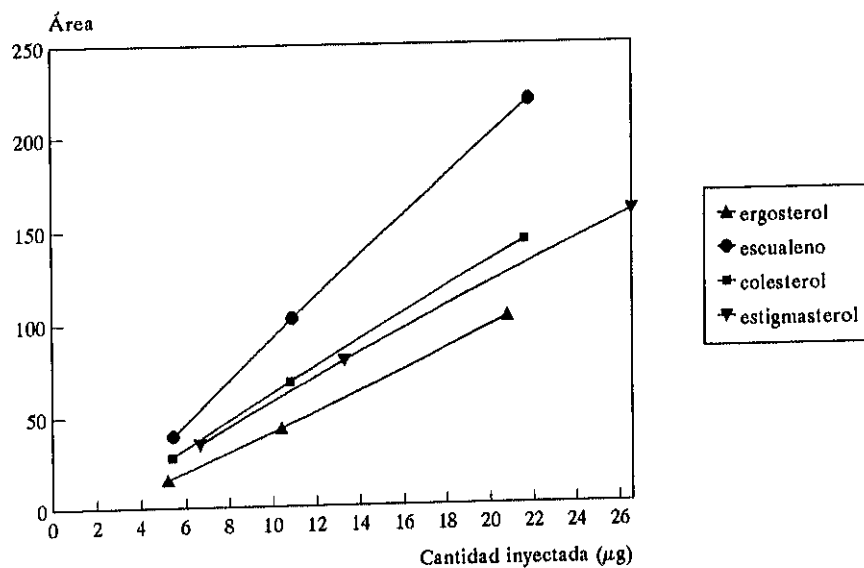


Figura 3.3.2.2b. Linealidad de respuesta. Condiciones del detector: 45 °C, 172 kPa.

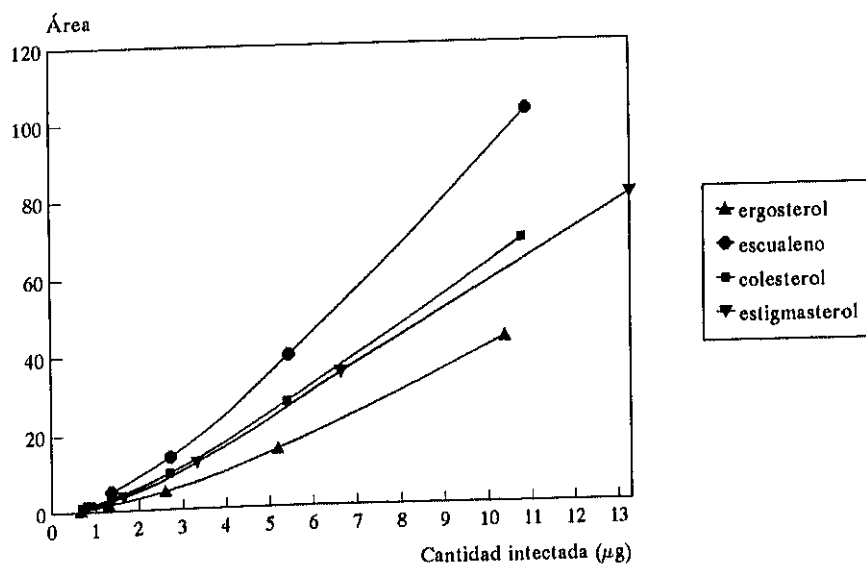


Figura 3.3.2.2c. Linealidad de respuesta. Condiciones del detector: 45 °C, 172 kPa.

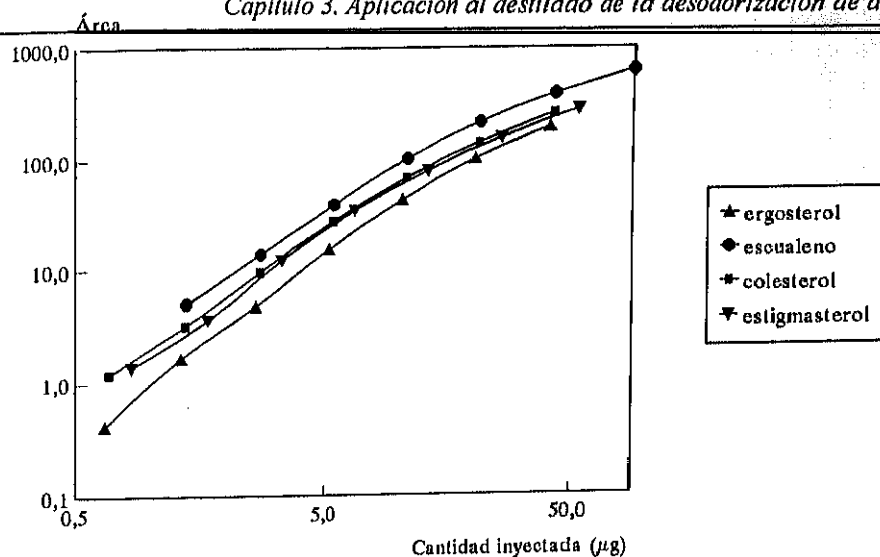


Figura 3.3.2.2d. Representación doble-logarítmica de la linealidad de respuesta. Condiciones del detector: 45 °C, 172 kPa.

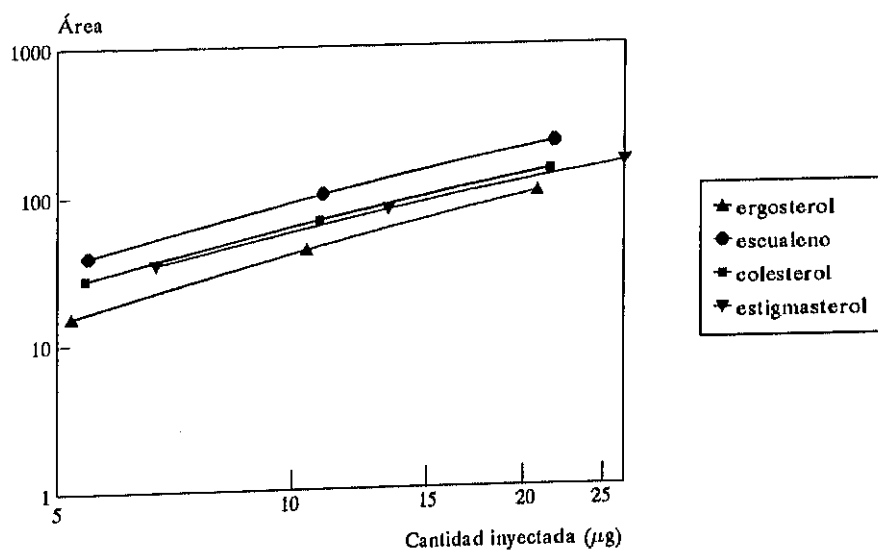


Figura 3.3.2.2e. Representación doble-logarítmica de la linealidad de respuesta. Condiciones del detector: 45 °C, 172 kPa.

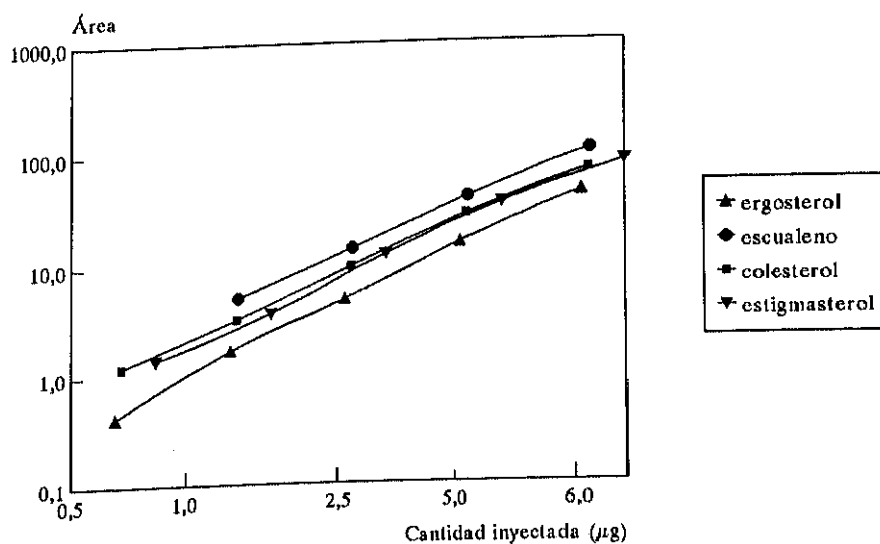


Figura 3.3.2.2f. Representación doble-logarítmica de la linealidad de respuesta. Condiciones del detector: 45 °C, 172 kPa.

excepto para las cantidades mayores, hecho que también se ha descrito en la bibliografía sobre triglicéridos y otros compuestos de baja polaridad (figuras 3.3.2d-f). Al realizar las regresiones, los valores del exponente  $x$  fueron de 1,55 para el ergosterol, 1,40 para el escualeno, 1,51 para el colesterol y 1,46 para el estigmasterol, encontrándose todos ellos dentro del intervalo aceptado por otros investigadores.

Los resultados del cálculo de la linealidad de respuesta obtenidos tras la optimización del detector mejoraron los previamente conseguidos. Las ecuaciones obtenidas fueron las siguientes:

- Ergosterol:	$\log A = 0,803 + 1,16 \cdot \log C;$	$r^2 = 0,9834;$
- Escualeno:	$\log A = 0,705 + 1,19 \cdot \log C;$	$r^2 = 0,9917;$
- Colesterol:	$\log A = 0,846 + 1,12 \cdot \log C;$	$r^2 = 0,9894;$
- Estigmasterol:	$\log A = 0,504 + 1,25 \cdot \log C;$	$r^2 = 0,9946;$

donde  $A$  = área,

$C$  = cantidad inyectada en  $\mu\text{g}$ .

Los valores hallados para  $x$  descendieron en los cuatro casos para hacerse más cercanos a la unidad, lo que significa que la respuesta se acerca más hacia una tendencia lineal. Estos resultados también posibilitaron la extensión de la respuesta exponencial hasta cantidades de 50  $\mu\text{g}$ . Las figuras 3.3.2.2(g y h) muestran la representación gráfica de las ecuaciones obtenidas, mostrándose, además, la adecuación con los datos experimentales. El límite de detección para cada compuesto se calculó a partir del error estándar de las regresiones obtenidas (EE), siendo el límite de detección la cantidad en  $\mu\text{g}$  que proporciona una respuesta tal que  $\log A = 2 \cdot \text{EE}$ .

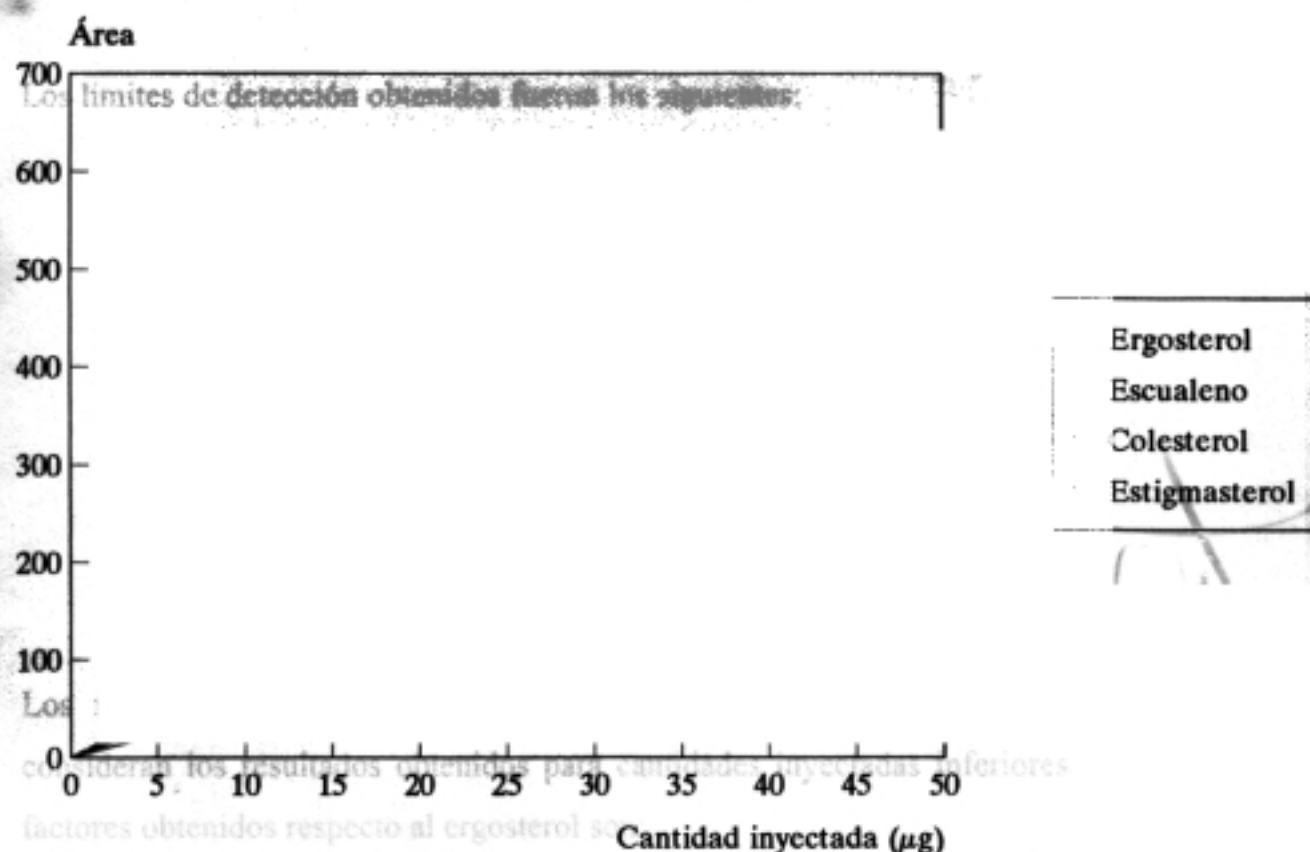


Figura 3.3.2.2g. Linealidad de respuesta. Condiciones del detector: 30 °C, 121 kPa.

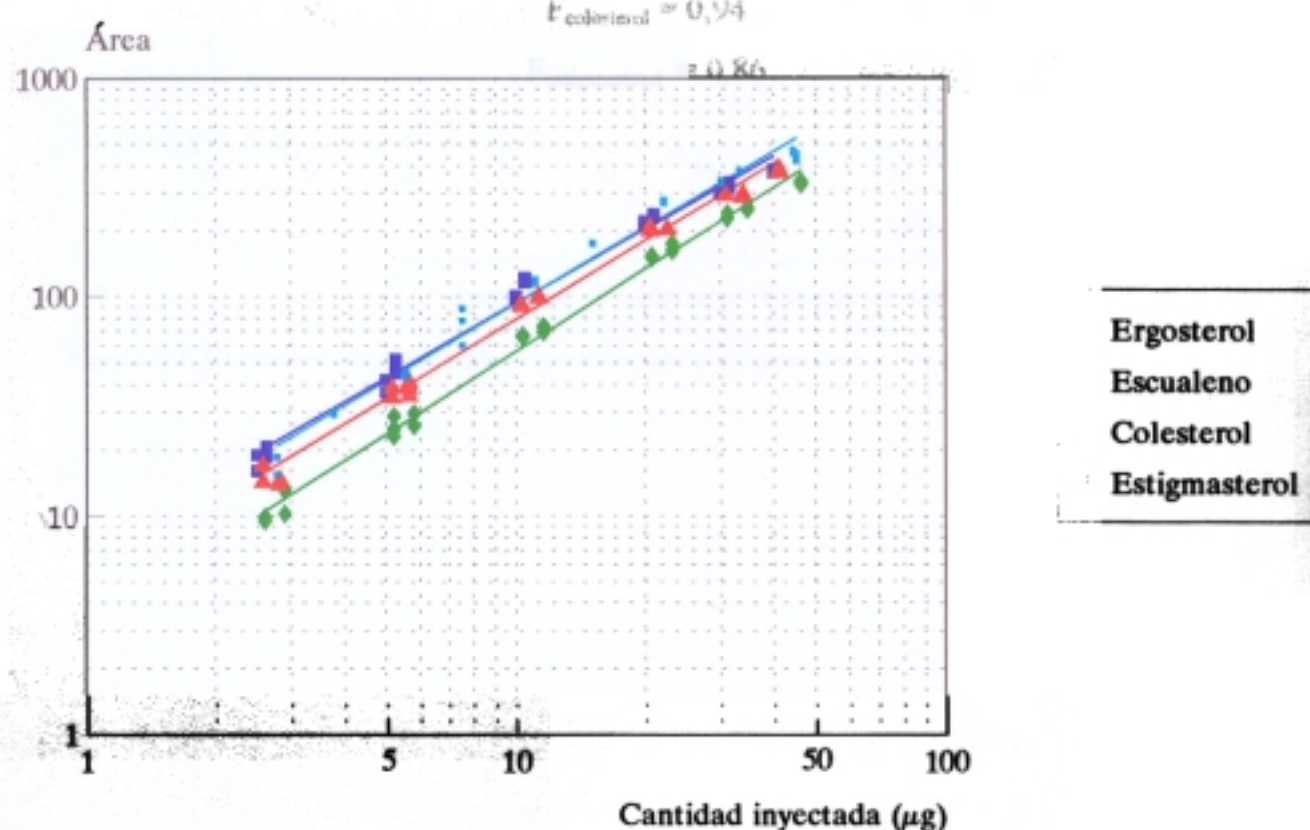


Figura 3.3.2.2h. Representación doble-logarítmica de la linealidad de respuesta. Condiciones del detector: 30 °C, 121 kPa.

Los límites de detección obtenidos fueron los siguientes:

- ergosterol: 0,26 µg;
- escualeno: 0,31 µg;
- colesterol: 0,22 µg;
- estigmasterol: 0,46 µg.

### 3.3.2.3- Factor de respuesta

Los factores de respuesta obtenidos se representan en la figura 3.3.2.3. Si no se consideran los resultados obtenidos para cantidades inyectadas inferiores a 2,5 µg, los factores obtenidos respecto al ergosterol son:

$$F_{\text{escualeno}} = 0,88$$

$$F_{\text{colesterol}} = 0,94$$

$$F_{\text{estigmasterol}} = 0,86$$

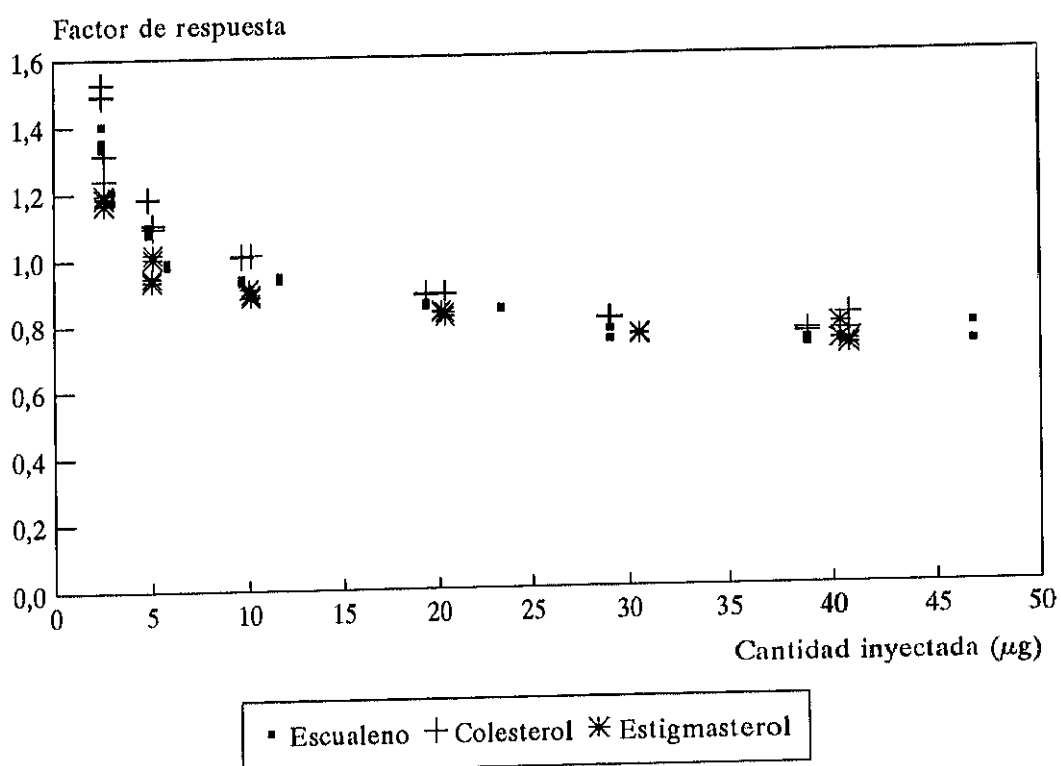


Figura 3.3.2.3. Factor de respuesta de los esteroides y el escualeno.



## ANÁLISIS DE LOS DESTILADOS DE LA DESODORIZACIÓN DE ACEITES VEGETALES POR ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^{13}\text{C}$ DE ALTA RESOLUCIÓN

### 3.4- MATERIALES Y MÉTODOS

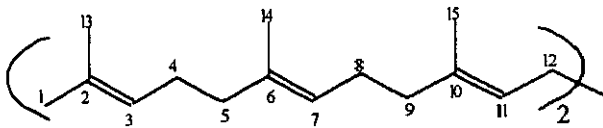
La preparación de las muestras y el procedimiento utilizado es el mismo que se detalla para los análisis de muestras de nata y sus extractos (apartado 2.6 y 2.7). Las muestras analizadas fueron:

- destilado de la desodorización de aceite de oliva,
- “                               “                               “                               girasol,
- extracto obtenido a 13 MPa, 40 °C y 70 min a partir del destilado de aceite de oliva.

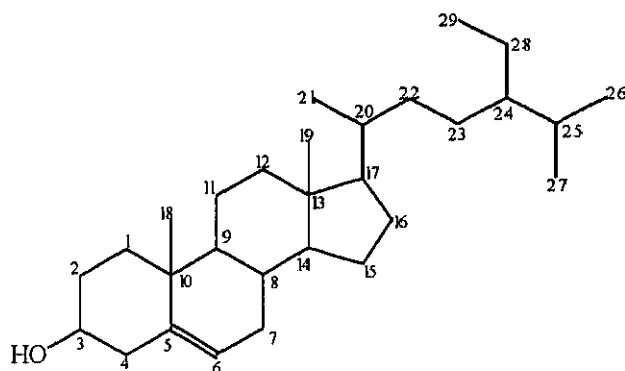
La identificación de los compuestos se llevó a cabo con la ayuda de tablas de desplazamientos químicos existentes en la bibliografía. La tabla 3.4 contiene los desplazamientos químicos correspondientes al escualeno (Breitmaier y col., 1975) y  $\beta$ -sitosterol (Wright y col., 1978).

Tabla 3.4. Desplazamientos químicos de escualeno y  $\beta$ -sitosterol.

Escualeno		$\beta$ -Sitosterol			
n°	$\delta$ (ppm)	n°	$\delta$ (ppm)	n°	$\delta$ (ppm)
1	25,7	1	37,31	16	28,26
2	131,2	2	31,57	17	56,11
3	124,4	3	71,69	18	11,87
4	26,7	4	42,25	19	19,40
5	39,8	5	140,76	20	36,17
6	134,8	6	121,59	21	18,82
7	124,4	7	31,92	22	33,95
8	26,8	8	31,92	23	26,13
9	39,8	9	50,17	24	45,85
10	135,0	10	36,51	25	29,18
11	124,4	11	21,11	26	19,84
12	28,3	12	39,81	27	19,07
13	17,7	13	42,33	28	23,09
14	16,0	14	56,79	29	12,32
15	16,0	15	24,32		



numeración de los carbonos del escualeno



numeración de los carbonos del  $\beta$ -sitosterol

Se calculó el porcentaje molar en que se encontraban los compuestos analizados de modo análogo al realizado con la grasa láctea.

### 3.5- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros de DDO obtenidos mediante  $^{13}\text{C}$ -RMN son los mostrados en las figuras 3.5(a-c), las figuras 3.5(d-f) muestran los espectros de DDG. A continuación, en la tabla 3.5a se detallan los desplazamientos químicos asignados a sus correspondientes carbonos, así como sus integrales para cada señal y en las muestras analizadas.

**Tabla 3.5a.** Desplazamientos químicos, grupos funcionales asignados e integrales correspondientes tras el análisis por  $^{13}\text{C}$ -RMN de los DD de aceites de oliva y girasol.

$\delta$ (ppm)	Carbono	Área		
		DDO		DDG
		Control	Extracto	
180,27	-COOH <sup>1</sup>	11,62	15,7	15,7
135,07	C10 (Es) <sup>2</sup>	2,6	3,2	-
134,86	C6 (Es)	2,6	3,2	-

tabla 3.5a (continuación)

$\delta$ (ppm)	Carbono	Área		
		DDO		DDG
		Control	Extracto	
131,19	C2 (Es)	2,9	3,1	-
130,19	C13 (L)	1,5	1,9	10,6
130,01	C9 (O,L)	15,0	16,8	15,9
129,71	C10 (O)	13,5	14,9	8,1
128,07	C10 (L)	1,5	1,9	9,0
127,91	C12 (L)	1,5	1,9	11,2
124,43	C3 (Es)	3,3	5,0	-
124,32 + 124,29	C7, C11 (Es)	6,5	10,1	0,8
60,16	n.a. <sup>3</sup>	0,3	1,6	-
39,73	C5,C9(Es)	5,7	10,7	-
34,10	C2	15,5	21,9	26,2
31,90	$\omega$ 3	15,4	20,6	19,5
31,52	$\omega$ 3 (L)	2,7	4,0	19,0
29,76- 28,83	$-(CH_2)_n-$	119,9	166,8	157,5
28,26	C12 (Es)	3,3	5,6	-
27,21 +27,15	$CH_2-CH=$ <i>cis</i>	23,8	32,4	33,3
26,77	C8 (Es)	2,5	4,8	-
26,66	C4 (Es)	2,5	4,8	-
25,65	C1 (Es) + C11 (L)	5,18	7,6	13,9
24,96	C3 (L)	2,6	3,0	} 26,6
24,68	C3	12,0	16,9	
22,67	$\omega$ 2	15,8	21,7	36,8
17,64	C13 (Es)	2,4	4,3	-
16,01	C14 (Es)	2,7	4,1	0,4

tabla 3.5a (continuación)

$\delta$ (ppm)	Carbono	Área		
		DDO		DDG
		Control	Extracto	
15,97	C15 (Es)	2,7	4,1	0,4
14,07	$\omega$ 1	15,2	21,5	27,2

<sup>1</sup> los carbonos no asignados a ningún compuesto definido se refieren al total de ácidos grasos libres de la muestra.

<sup>2</sup> Es = escualeno,

<sup>3</sup> n a = no asignado

Los componentes principales, tanto del DDO, DDG, como del extracto analizado fueron los ácidos grasos libres, de este modo se comprobó que estos compuestos son también extraídos por el dióxido de carbono supercrítico. Los ácidos grasos mayoritarios fueron los insaturados: oleico en el DDO, y linoleico y oleico respectivamente en el DDG. Los ácidos grasos saturados se encontraron en menor proporción. No se detectó la presencia de ácidos grasos de cadena corta, que sí aparecen como consecuencia de tratamientos de calentamientos severos, como las frituras (Coll Hellín y Clausell, 1985). Estos resultados indicaron que la composición en ácidos grasos de los destilados es muy semejante a la del aceite virgen, aunque en los primeros se encuentran libres. No se detectó la existencia de triglicéridos, tampoco de otros lípidos saponificables como son los ésteres metílicos y etílicos de los ácidos grasos, tan abundantes en otros estudios realizados por otros investigadores (24,1%; Bondioli y col., 1993).

La fracción insaponificable del DDO y su extracto estuvo compuesta en su gran mayoría por escualeno, y no se detectó la presencia de ningún otro compuesto. La proporción de escualeno encontrada en el DDO fue muy superior a la del DDG, donde únicamente pudo cuantificarse la cantidad de escualeno partiendo de aquellos carbonos con tiempo de relajación más corto (carbonos metílicos); sin embargo, éste pudo detectarse gracias a la apreciación de señales menores no cuantificables. Asimismo, pudo ser detectada la

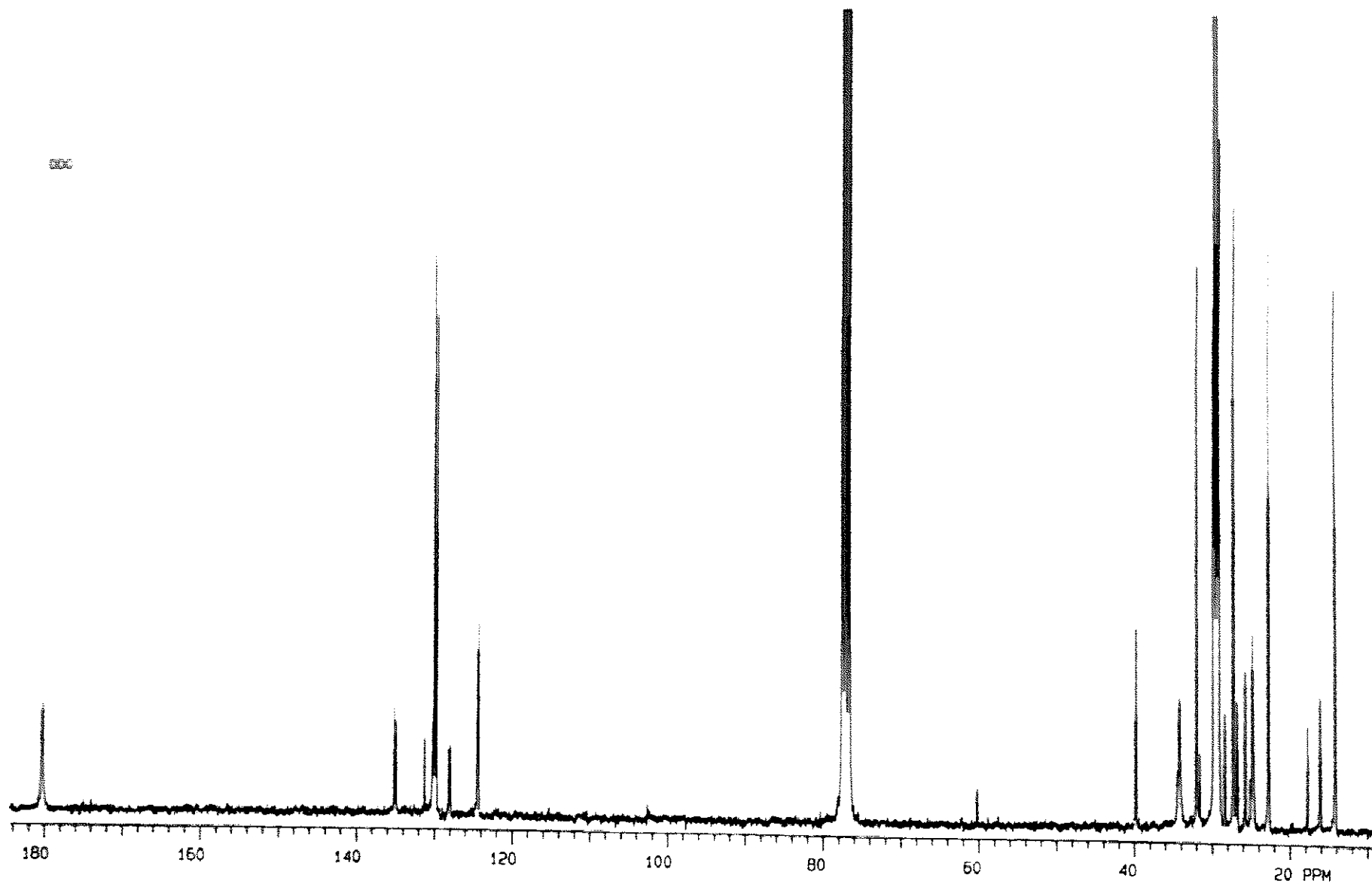


Figura 3.5.a. Espectro del destilado de la desodorización de aceite de oliva por  $^{13}\text{C}$ -RMN

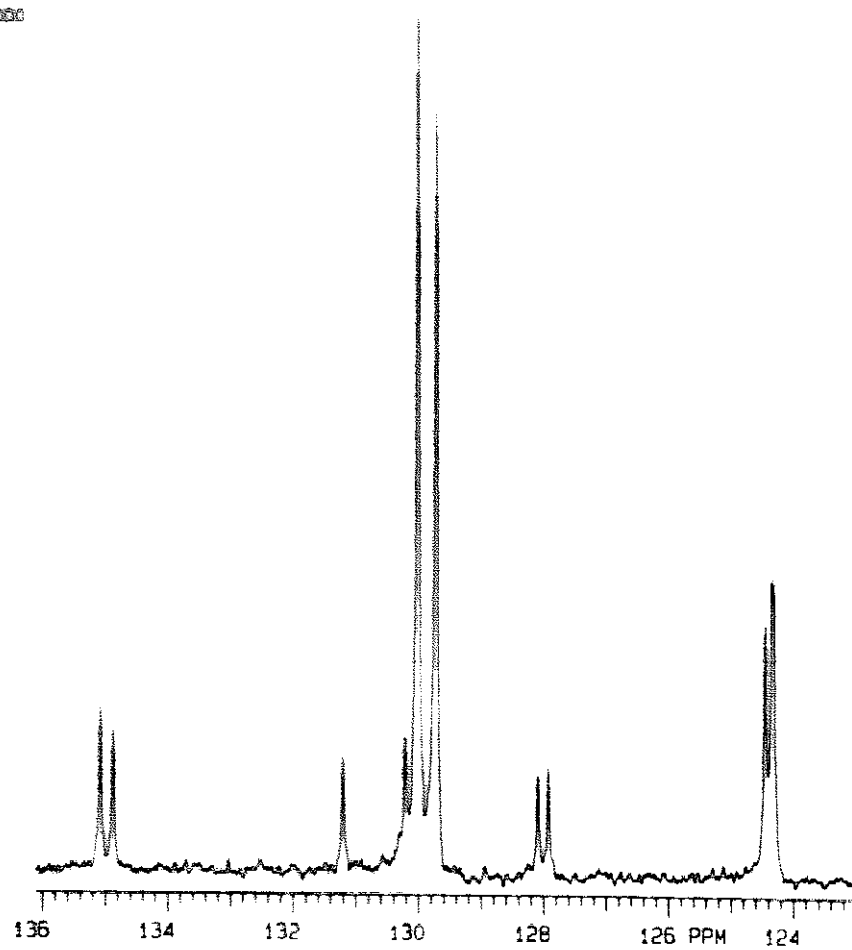


Figura 3.5.b. Región olefínica del DDO

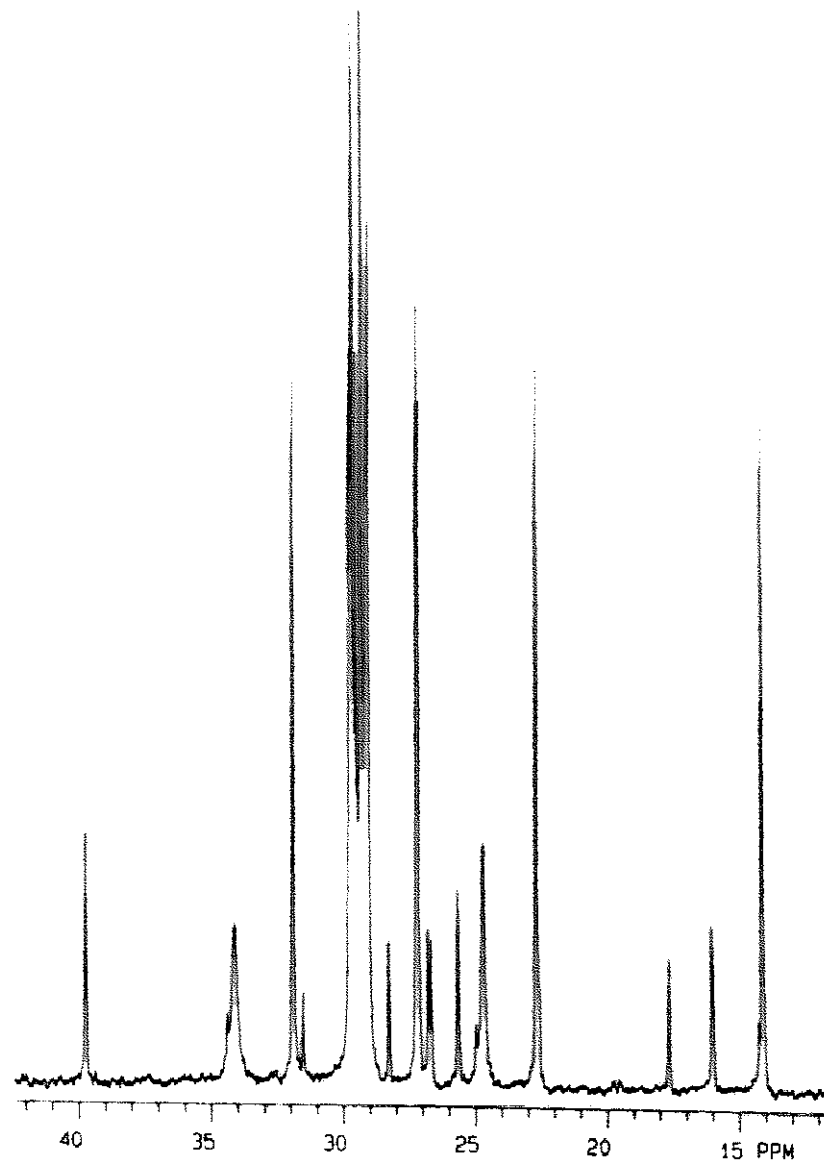


Figura 3.5.c. Región de carbonos saturados del DDO

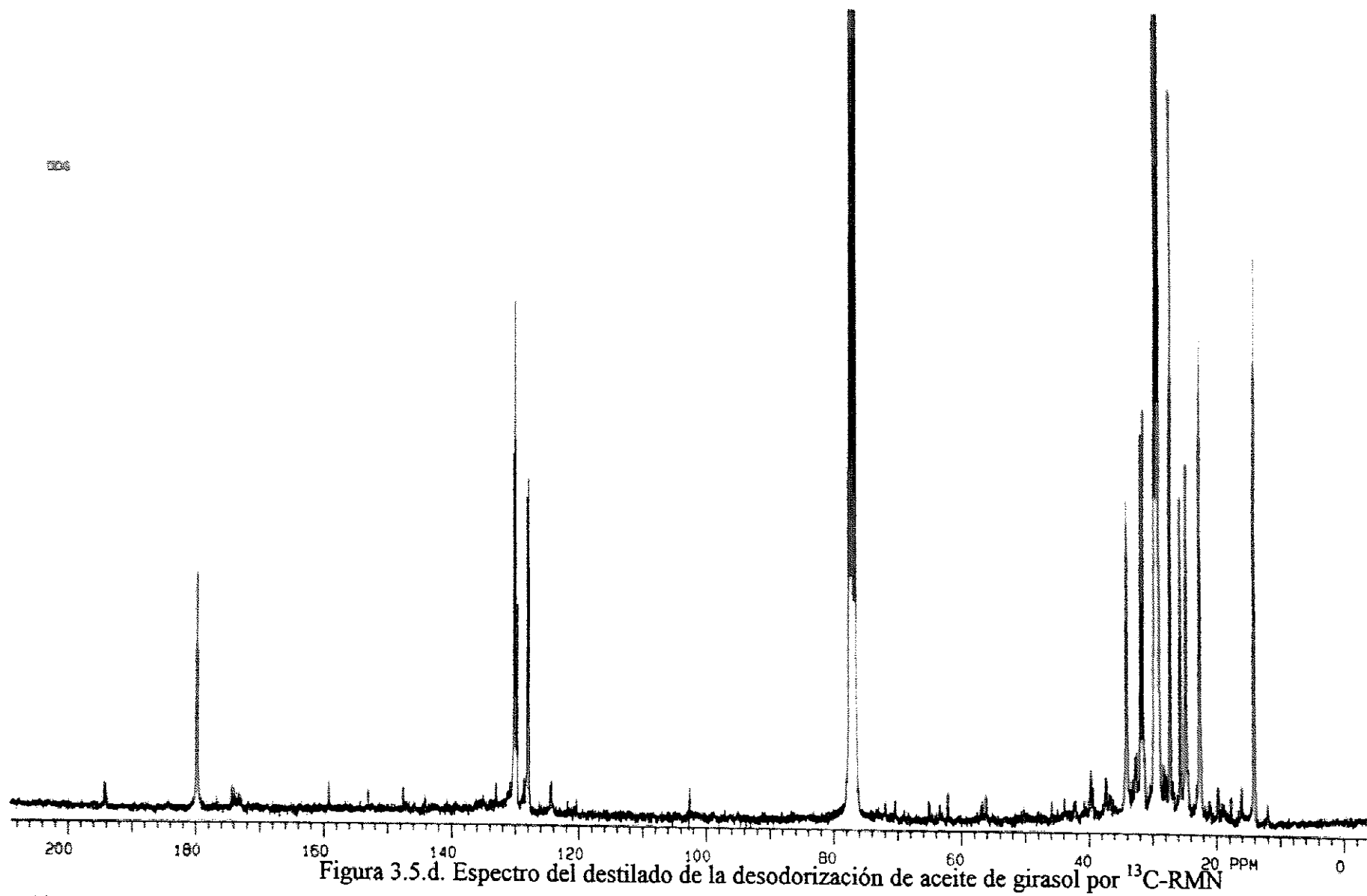


Figura 3.5.d. Espectro del destilado de la desodorización de aceite de girasol por  $^{13}\text{C}$ -RMN



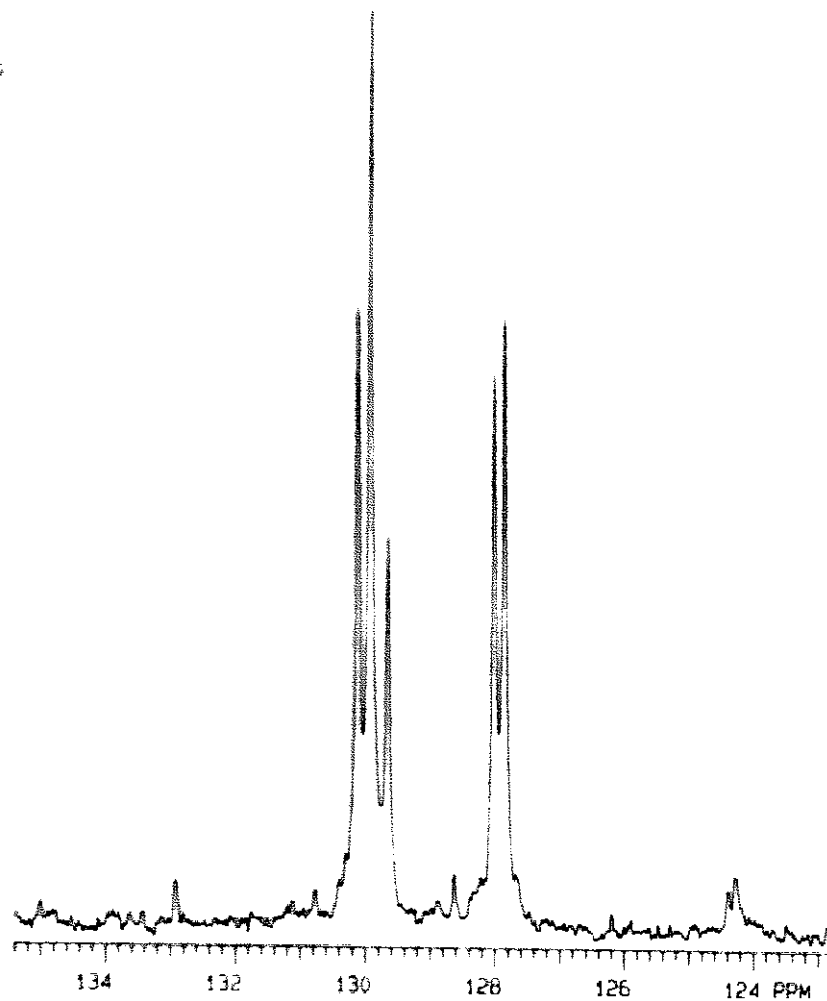


Figura 3.5.e. Región olefinica del DDG

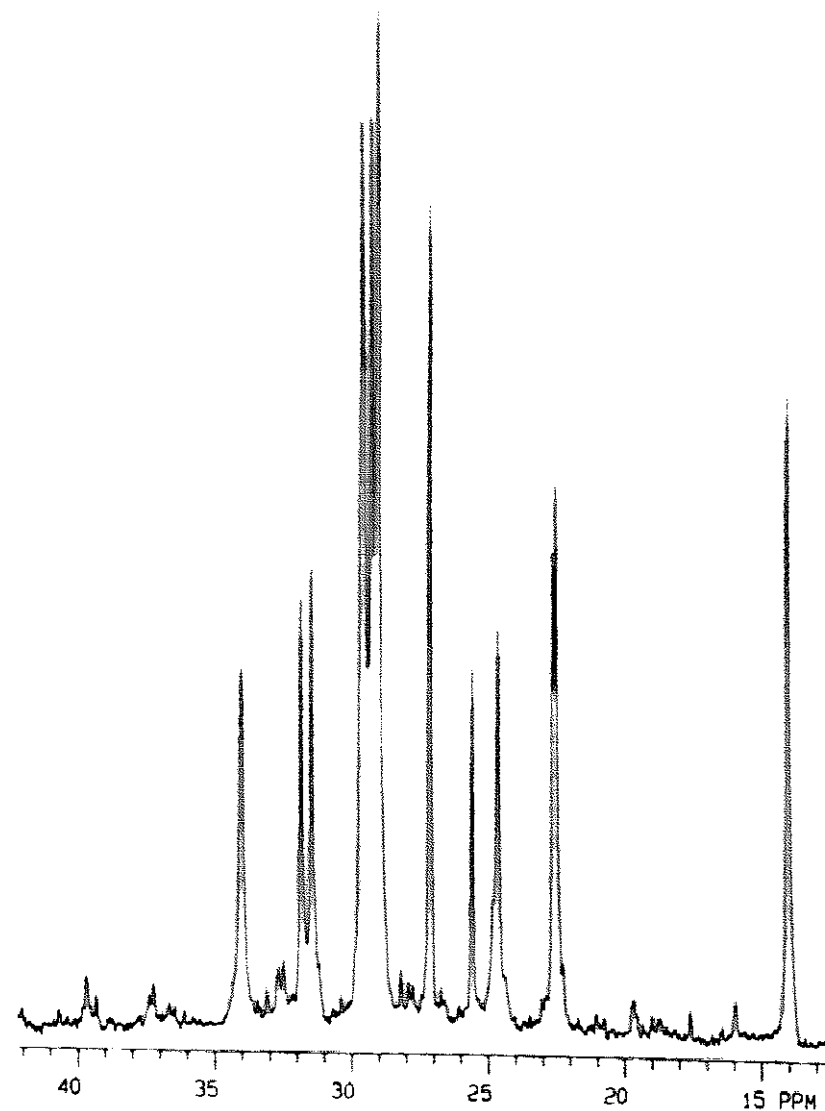


Figura 3.5.f. Región de carbonos saturados del DDG

presencia de compuestos esterólicos en el DDG, lo que no ocurrió en el DDO. La baja intensidad de las señales de éstos compuestos junto con la similitud de sus  $\delta$  (Wright y col., 1978) no permitió distinguir entre la existencia de  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol u otro estero. La composición del DDO y su extracto fue bastante similar.

Seguidamente, la tabla 3.5b recoge los resultados obtenidos para la cuantificación de los componentes de los destilados:

Tabla 3.5b. Composición de los DD de aceites de oliva y girasol.

		DDO		DDG
		Control	Extracto	
Escualeno <sup>1</sup>	$\left( \frac{C15 \times 100}{C15 + \omega 1} \right)$	15,08	16,02	1,45
Insaturado/saturado <sup>2</sup>	$\left( \frac{CH_2 - CH = /2}{\omega 1 - (CH_2 - CH = /2)} \right)$	3,61	3,06	1,58
Oleico/linoleico <sup>2</sup>	$\left( \frac{C10(O)}{C10(L)} \right)$	9,00	7,84	0,71

<sup>1</sup>(%mol).

<sup>2</sup>ácidos grasos libres (mol/mol).

El hecho de utilizar los carbonos metílicos y metilénicos para cuantificar los compuestos de las muestras se debe a que poseen tiempos de relajación menores, con lo cual, los resultados obtenidos en las integraciones son los más próximos a los valores reales. Esto se observa claramente si se comparan las integrales obtenidas para los carbonos  $\omega 1$  y los carboxílicos, los segundos poseen integrales menores debido a unas relajaciones incompletas. El uso de los carbonos olefinicos es el más conveniente para el cálculo de la relación molar entre ácidos oleico y linoleico, por existir por separado señales características de cada uno de ellos. Los tiempos de relajación no influyen en el cálculo al tratarse de señales muy próximas.

Los resultados obtenidos tras los análisis del DDO y su extracto son muy similares, con lo que se podía concluir que en esas condiciones la selectividad en la extracción era baja y los compuestos se encuentran en las mismas proporciones antes y después de la extracción supercrítica.

No se pudieron establecer comparaciones entre la composición de los destilados y los aceites vírgenes de los que procedieron al no disponer de ellos. En cuanto a los datos encontrados en la bibliografía acerca de la composición de los aceites vírgenes de oliva y girasol (Gunstone y col., 1986) se vio que existía una gran variabilidad; sin embargo, se pudo concluir que la composición de los destilados estaba dentro de los rangos de composición de los aceites vírgenes en lo referido únicamente a la composición en ácidos grasos y con la diferencia de que en los destilados se encuentran en forma carboxílica libre y en los aceites se encuentran esterificados al glicerol constituyendo los triglicéridos.

Si consideramos que los ácidos grasos libres del DDO son oleico y palmítico (los mayoritarios) obtenemos que el escualeno se encuentra en una concentración de 208 g/Kg. Esta concentración es sensiblemente mayor a la encontrada en el aceite virgen (alrededor de 1,5 mg/Kg, Fedeli, 1977).

## APLICACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO AL DESTILADO DE LA DESODORIZACIÓN DE ACEITES VEGETALES

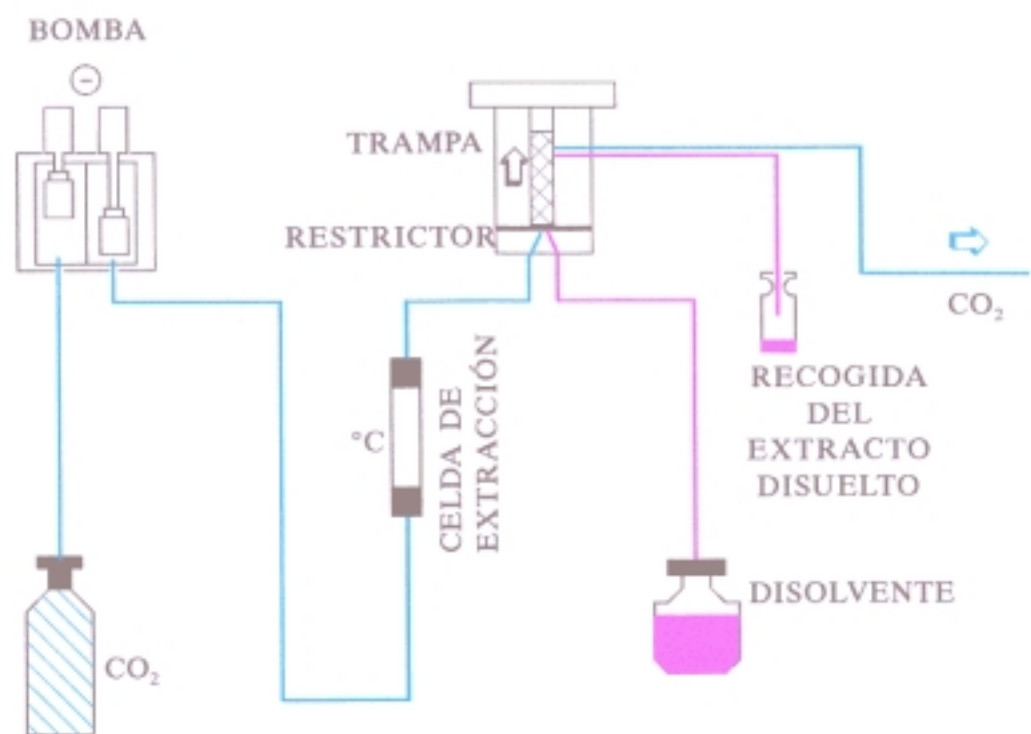
### 3.6- MATERIALES Y MÉTODOS

#### *3.6.1- Descripción del equipo extractor*

Las extracciones con fluidos supercríticos se llevaron a cabo con un extractor Hewlett-Packard modelo 7680A equipado con un restrictor variable que permite el control independiente del flujo y la presión, y además produce una despresurización instantánea del fluido supercrítico a su salida. La muestra se deposita en una celda cilíndrica de acero inoxidable de 7 mL de volumen; para la recogida del extracto el equipo está provisto de una trampa sólida intercambiable, donde se produce la caída de presión mencionada, que se lava posteriormente con un disolvente orgánico para la recuperación del extracto retenido. El control del sistema se realiza automáticamente a través de un programa informático específico suministrado con el equipo, con un ordenador Hewlett-Packard modelo Vectra QS/165. El fluido supercrítico usado fue dióxido de carbono de calidad analítica. Existe también un sistema criogénico mediante dióxido de carbono para enfriar la bomba, celda de extracción, restrictor y trampa, y que no necesariamente ha de ser de calidad tan alta como el supercrítico. La figura 3.6.1 muestra un esquema del funcionamiento del equipo.

#### *3.6.2- Optimización en la preparación de la muestra*

La celda se preparó para la extracción introduciendo el destilado, habiendo taponado previamente la entrada y salida de la celda con lana de vidrio. Con este método se producían contaminaciones en la líneas del extractor, ya que la muestra es líquida y sale por la parte inferior de la celda, contaminando las extracciones posteriores. Por ello, se decidió utilizar arena de mar lavada (Panreac) en una cantidad de 5 g para servir de



**Figura 3.6.1. Esquema del equipo extractor**

soporte del destilado. Tanto la arena como la lana de vidrio no se extraían ni retenían los compuestos de la muestra. La cantidad de muestra introducida dependió de dos factores: a) que el extracto se obtuviera en la mayor cantidad posible y b) que la arena no quedara saturada de muestra y ésta pasara hacia los conductos del extractor.

Las muestras fueron destilados de la desodorización de aceites de oliva y girasol.

### *3.4.3- Efecto de la presión y la temperatura en la extracción del destilado de la desodorización de aceites vegetales*

Se estudió la cantidad de destilado extraído en función de la temperatura y la presión aplicadas en la celda. En los diferentes métodos utilizados se consideraron los valores de las siguientes variables:

- flujo del fluido supercrítico: 1 y 3 mL/min,
- tiempo de extracción: 20 y 30 min,
- fraccionamientos: hasta los 70 min con frecuencias de 2, 5 y 10 min,
- temperatura de la celda de extracción: 40, 50 y 60 °C,
- presión: 10; 13; 15; 17,5; 20; 22,5; 25 y 30 MPa,
- disolvente de lavado: cloroformo:metanol (2:1),
- trampa para recoger los extractos: de bolas de acero inoxidable (Hewlett-Packard).

En los primeros ensayos realizados, el extracto fue depositado sobre la superficie de las bolas de acero de la trampa, que se lavó con la mezcla de disolventes mencionada tras completar la extracción, recogiendo las disoluciones en viales de 1 mL. El número de viales utilizado fue de 6 para asegurar la completa disolución del extracto y averiguar a la vez el número mínimo de viales necesarios, que se encontró ser de 2. La cantidad de extracto se obtuvo por pesada tras la evaporación del disolvente en una corriente de N<sub>2</sub>.

En todos los casos se mantuvo la trampa a 20 °C y el restrictor a 45 °C durante la extracción, elevándose la temperatura de la trampa a 45 °C durante el lavado de la misma con disolvente.

Los fraccionamientos se realizaron manteniendo presión y temperatura de la celda constantes. Finalizado el tiempo de extracción de cada fracción se acomodaban las condiciones de lavado, recogiendo los viales con la disolución, y posteriormente se continuaba con un nuevo paso extractivo del fraccionamiento.

Asimismo, se colocaron frascos con la mezcla cloroformo:metanol (2:1) a la salida haciendo burbujear el CO<sub>2</sub> gaseoso que sale del extractor con el fin de retener los restos de extracto arrastrado por el gas.

Los extractos obtenidos se analizaron por cromatografía líquida de alta eficacia (según los apartados 3.2 y 3.3).

#### *3.4.4- Modificación del equipo de extracción*

Las modificaciones realizadas en el extractor se encaminaron a obtener todo el extracto producido, para que no existieran pérdidas, y, a la vez, a mejorar la repetibilidad de las extracciones.

### 3.5- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### *3.5.1- Optimización en la preparación de la muestra*

Se comprobó que una cantidad superior a 400 mg de muestra producía una saturación de la arena, pasando el destilado al interior de las líneas del equipo, contaminándolo. Dado que la cantidad de arena utilizada era la máxima admisible debido a la capacidad de la celda de extracción, se tomó la cantidad de 400 mg como la mayor posible para la obtención de extractos sin producirse contaminación ni pérdidas hacia el interior del equipo.

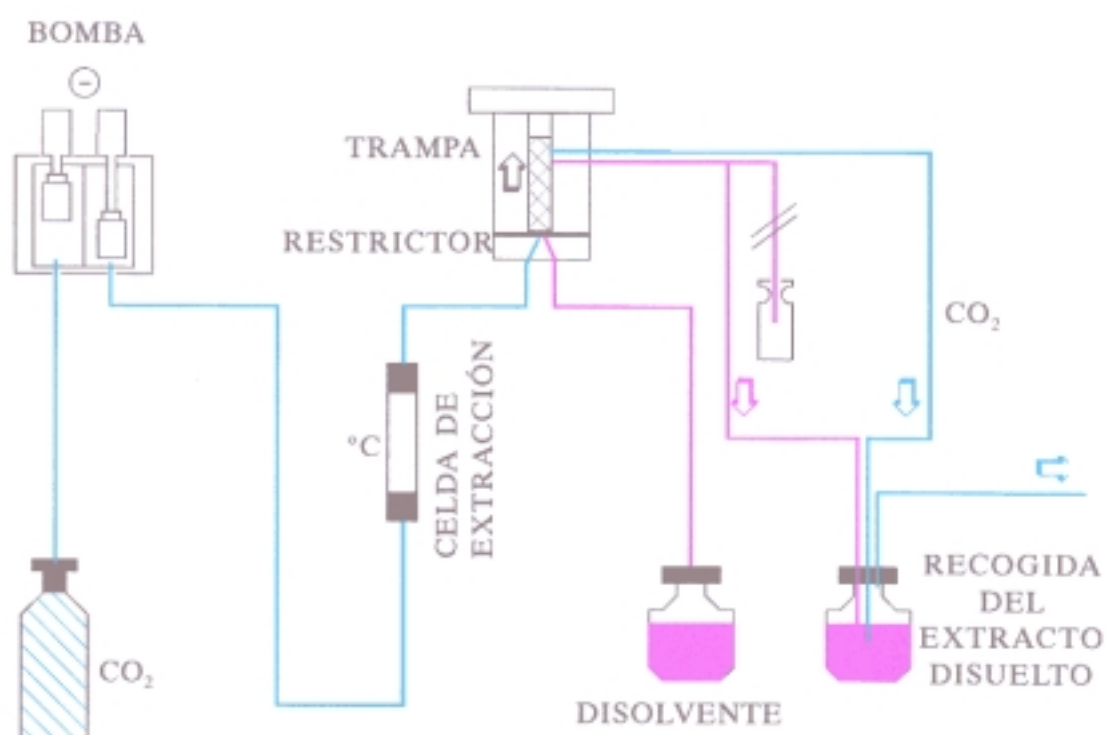
Sin embargo, tal como se comprobó posteriormente, la trampa de bolas de acero no permitía la retención de altas cantidades de extracto, por lo que hubo que reducir la cantidad de muestra a la máxima permitida por la trampa, que fue de 80 mg. Esta reducción dificultó la obtención de mayores extractos.

La modificación llevada a cabo en el equipo extractor (apartado 3.7.2) permitió nuevamente el uso de cantidades de muestra de 400 mg.

#### *3.7.2- Modificación del equipo extractor*

La figura 3.7.2a representa el esquema del extractor una vez modificado. La modificación consistió en burbujear el  $\text{CO}_2$  gaseoso en un frasco que contenía la mezcla cloroformo:metanol (2:1) empleada (200 mL) para impedir que se perdiera extracto por arrastramiento de moléculas de soluto por el gas tras la despresurización. El realizar la modificación fue necesario tras descubrir que se producían pérdidas de la muestra extraída.





**Figura 3.7.2a. Esquema del equipo extractor modificado**

Otra modificación necesaria fue la de obviar la salida del extracto disuelto procedente de la trampa hacia los viales. En su lugar, se procedió a conducirlo al frasco de burbujeo. La cantidad de extracto se obtuvo por pesada tras la evaporación del disolvente a presión reducida.

Los primeros resultados obtenidos se ilustran en la figuras 3.7.2b. Estos resultados se obtuvieron previamente a la modificación del equipo y con una cantidad de muestra de 400 mg. Se observó que fraccionamientos realizados con frecuencias de 5 min a 40 °C con diferentes presiones conducían a resultados en la extracción total difícilmente explicables, ya que a las presiones más bajas (13 MPa) se obtenía mayor cantidad de extracto que a las mayores presiones y así sucesivamente. Del mismo modo, se observó que el máximo en la extracción se alcanzaba antes en el tiempo para presiones mayores (25 MPa), pero el rendimiento era siempre menor a que bajas presiones. Tras alcanzarse el máximo de extracción se producía una extracción nula de destilado en las siguientes fracciones.

La figura 3.7.2c muestra la variación en la cantidad extraída en los fraccionamientos dependiendo de la duración de cada paso en las condiciones de 13 MPa y 40 °C. Los fraccionamientos realizados con frecuencias de 5 min condujeron a la obtención de mayores cantidades de extracto, mientras que la cantidad de extracto disminuyó conforme aumentaba la duración de cada paso, siendo menor con fracciones de 10 min. Las extracciones llevadas a cabo en un solo paso con una duración de 70 min produjeron extractos mínimos. La imposibilidad de la explicación de los resultados obtenidos se resolvió cuando se comprobó que la cantidad de extracto restante se eliminaba por arrastramiento del CO<sub>2</sub> gas tras la despresurización. La colocación de frascos con disolvente en la salida del gas para la extracción de 70 min en un solo paso permitió confirmar esta hipótesis ya que las cantidades perdidas se recuperaron y llegaron a igualar a las cantidades extraídas en los fraccionamientos de 5 min (también indicado en la figura 3.7.2c). Este hecho se debe a que la trampa de bolas de acero es incapaz de retener todo el extracto, llegada una cantidad, ésta queda saturada y el resto de extracto se pierde junto

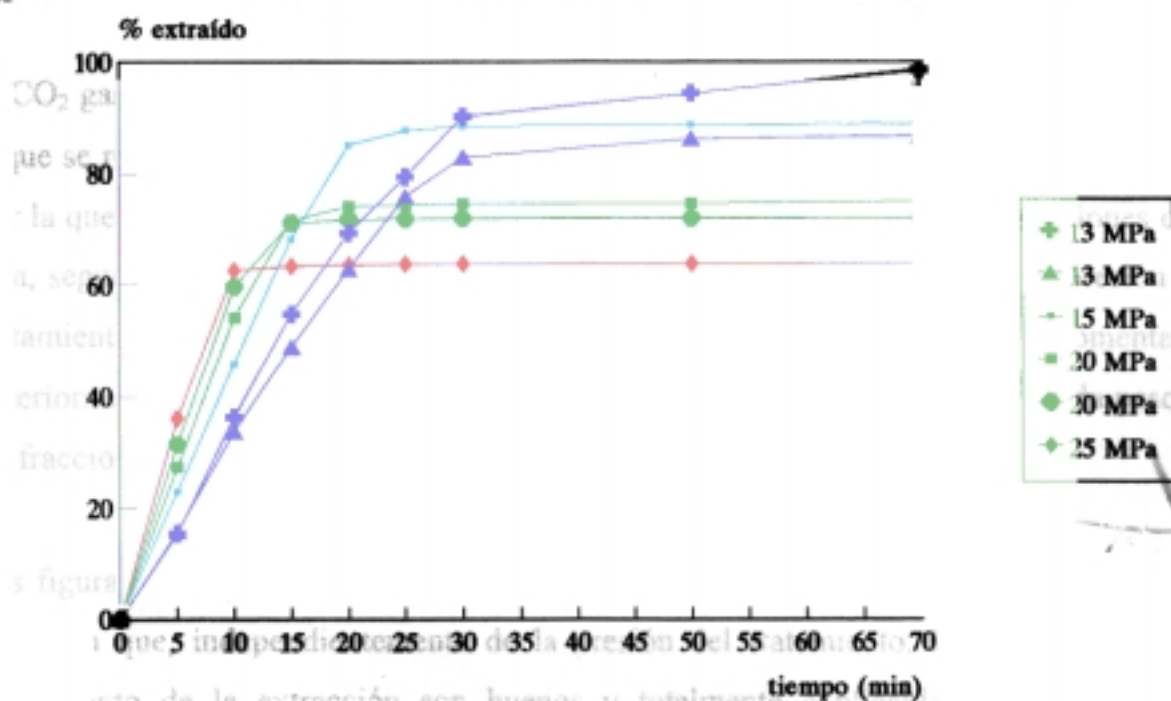


Figura 3.7.2b. Extractos de destilado de oliva obtenidos a 40 °C. Fraccionamientos de 5 min.

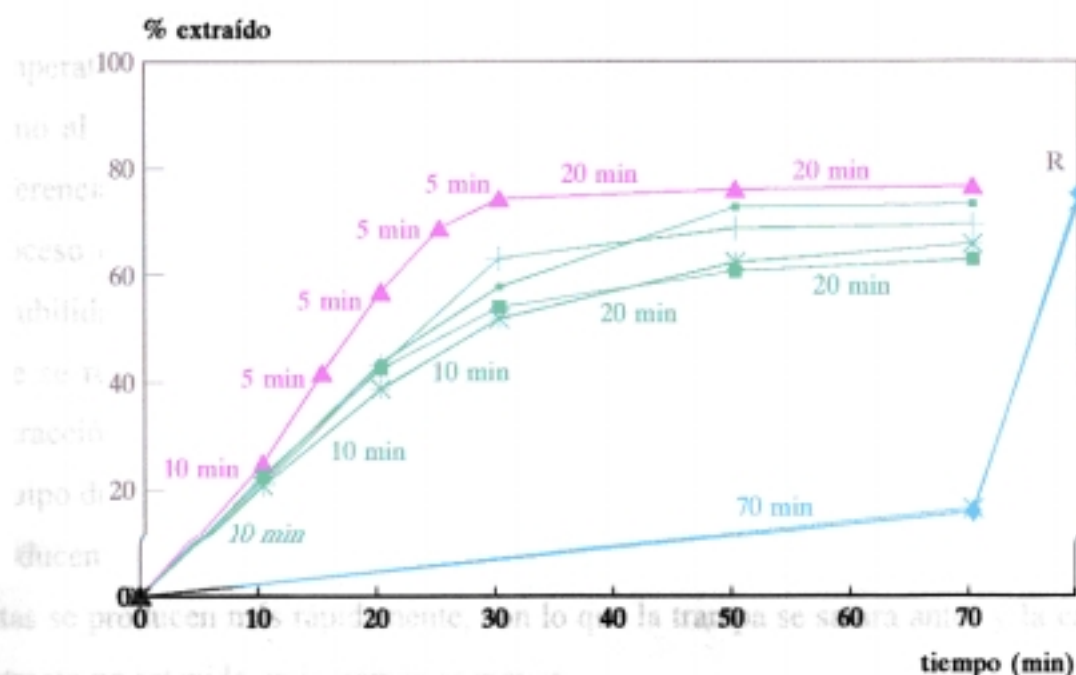
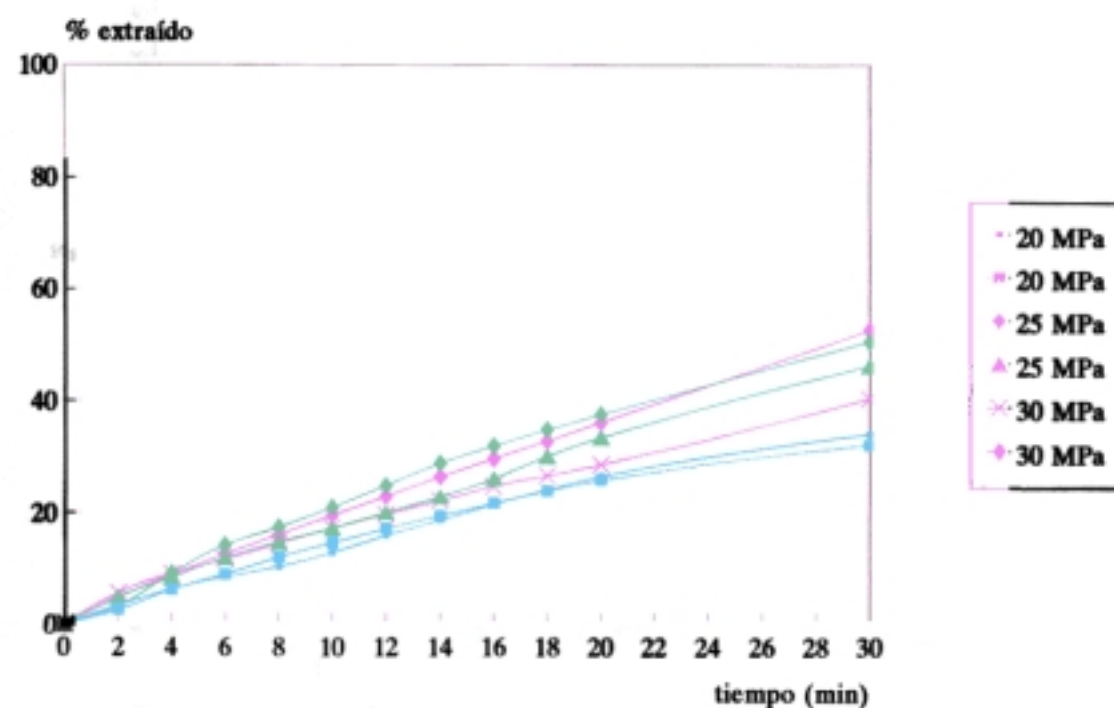
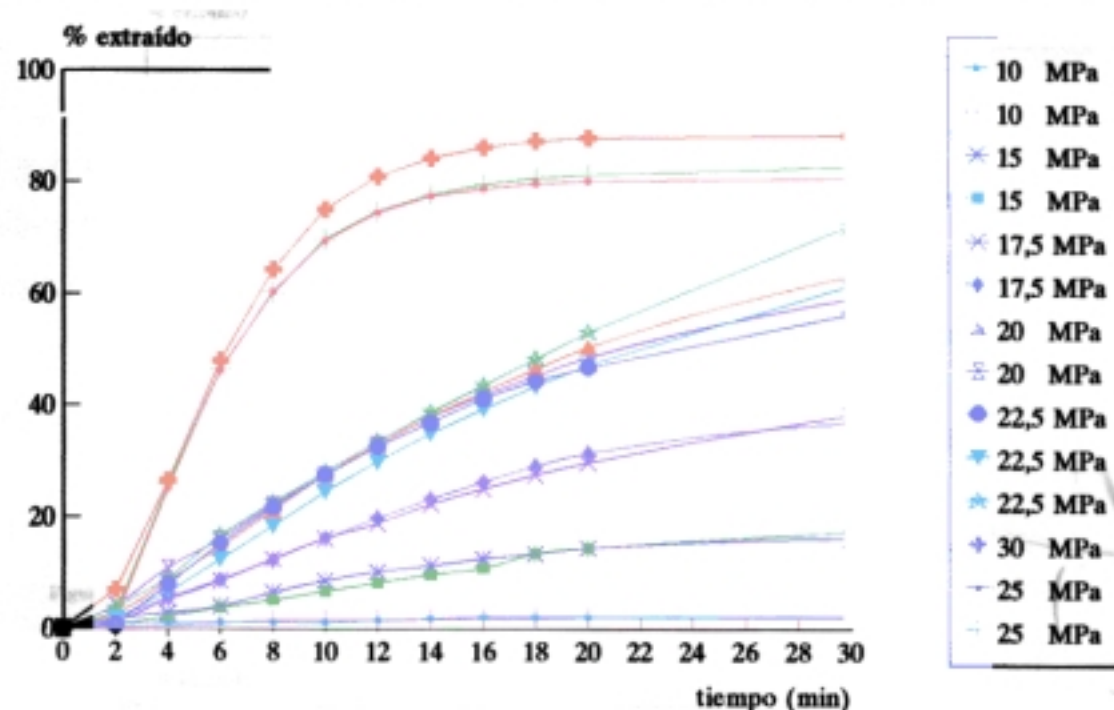


Figura 3.7.2c. Extractos de destilado de oliva obtenidos a 13 MPa, 40 °C. Fraccionamientos cada 5 y 10 min. Extracciones de 70 min con recogida de extracto arrastrado por el dióxido de carbono gaseoso (R).

al CO<sub>2</sub> gaseoso. El fraccionamiento en tiempos cortos permite que la trampa no se sature y que se recupere para el siguiente paso tras el lavado con el disolvente. Esta es la razón por la que los resultados más satisfactorios se alcanzaron para tiempos de fracciones de 5 min, seguidos de 10 min y por último de 70 min (figura 3.7.2c). Al elevar la presión del tratamiento se produce una más rápida extracción por lo que los efectos comentados anteriormente se hacen más patentes y provocan que el tiempo necesario de cada paso en un fraccionamiento se reduzca hasta 2 min.

Las figuras 3.7.2d para los tratamientos a 40 °C y 3.5.2e para los tratamientos a 60 °C muestran que, independientemente de la presión del tratamiento, los resultados en el rendimiento de la extracción son buenos y totalmente explicables si los pasos del fraccionamiento tienen una duración de 2 min. Las condiciones de mayor extracción se alcanzan a 30 MPa y 40 °C, siendo ya total la extracción a los 20 min de tratamiento. A medida que disminuye la presión de estudio a temperatura y tiempo constante disminuye el rendimiento obtenido, existiendo una gran diferencia entre los resultados obtenidos a 25 y 22,5 Mpa, hecho explicable por el descenso de densidad que se produce. A la temperatura de 60 °C los rendimientos obtenidos son menores que a 40 °C girando en torno al 40%, y las diferencias debidas a la presión utilizada son menos patentes. Las diferencias entre obtenidas entre las extracciones a 40 °C y a 60 °C se deben a que el proceso determinante en la extracción es el debido a la densidad y el aumento de la solubilidad de los compuestos a extraer, tanto a altas, medias o bajas presiones, y en lo que se refiere únicamente a la cantidad de extracto. Al comparar el rendimiento de la extracción habiéndose realizado el fraccionamiento o no, y antes de la modificación del equipo de extracción (figura 3.7.2f), se observa claramente que las mayores diferencias se producen entre las extracciones a 40 °C y a presiones sucesivamente mayores ya que éstas se producen más rápidamente, con lo que la trampa se satura antes y la cantidad de extracto no retenido en la trampa es mayor.

La baja capacidad de la trampa para retener el extracto y la consecuente necesidad de realizar fraccionamientos en pasos muy cortos condujo a que los métodos utilizados no



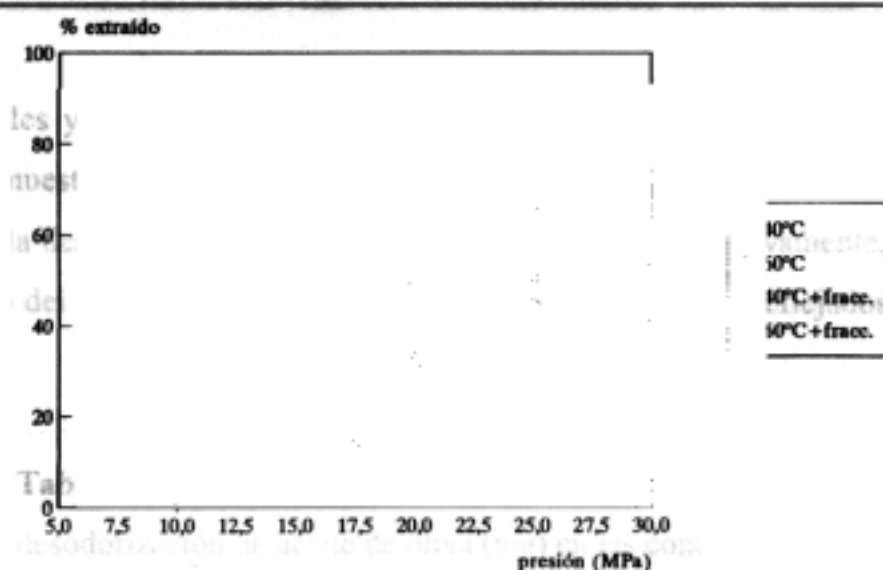


Figura 3.7.2f. Extractos obtenidos tras 30 min sin y con fraccionamientos.

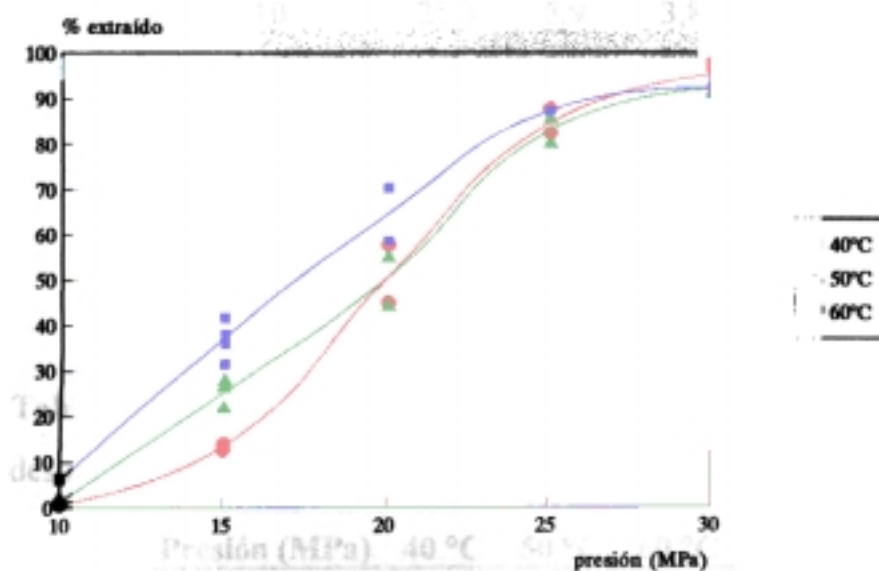


Figura 3.7.2g. Extractos de destilados de aceite de oliva obtenidos tras la modificación del equipo.

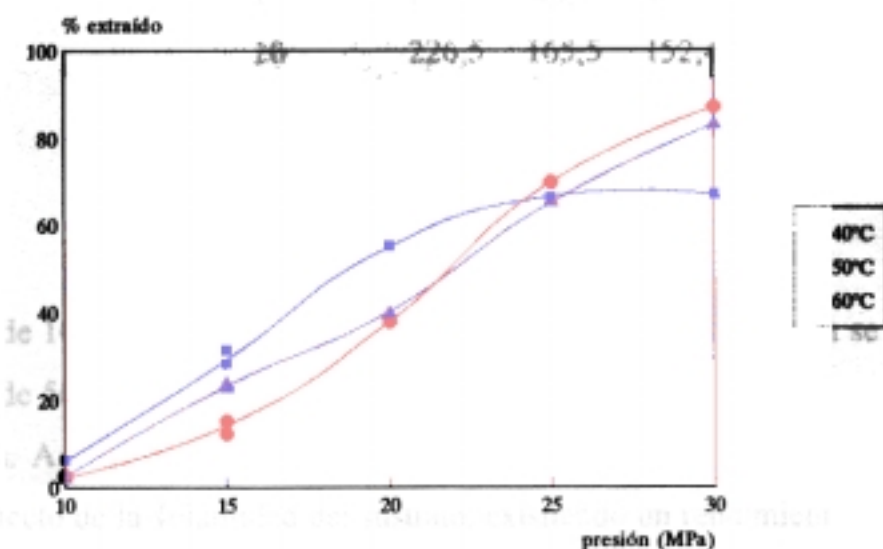


Figura 3.7.2h. Extractos de destilado de aceite de girasol obtenidos tras la modificación del equipo.

fueran factibles y fue necesaria la modificación del equipo de extracción. Las figuras 3.7.2g y h muestran los resultados obtenidos para los tratamientos de extracción del destilado de la desodorización del aceite de oliva y girasol respectivamente, utilizando el acoplamiento del frasco de burbujeo. Estos datos quedan también reflejados en las tablas 3.7.2a y b.

Tabla 3.7.2a. Extractos obtenidos a partir del destilado de la desodorización de aceite de oliva (mg) en las condiciones indicadas.

Presión (MPa)	40 °C	50 °C	60 °C
10	25,3	5,9	3,8
15	155,0	116,1	5,7
20	237,9	221,7	230,4
25	326,8	345,4	355,4
30	377,2	363,8	382,6

Tabla 3.7.2b. Extractos obtenidos a partir del destilado de la desodorización de aceite de girasol (mg) en las condiciones indicadas.

Presión (MPa)	40 °C	50 °C	60 °C
10	25,7	10,1	10,9
15	113,2	93,4	61,8
20	226,5	165,5	152,4
25	261,2	264,6	284,1
30	273,3	341,0	345,9

A presiones de 10, 15 y 20 MPa el máximo rendimiento de la extracción se produce a 40 °C, seguido de 50 y 60 °C debido a que la densidad del fluido es el factor dominante en la extracción. A la presión de 25 MPa se produce un equilibrio entre la densidad del fluido y el efecto de la volatilidad del sustrato, existiendo un rendimiento semejante a las

tres temperaturas de estudio; esto mismo se produce entre 50 y 60 °C a 20 MPa. El cambio de densidad provocado por la compresibilidad del fluido es poco notable entre 25 y 30 MPa, sin embargo, es marcado el efecto del aumento de la presión de vapor por aumento de la temperatura; esto conduce que el mayor rendimiento se alcance a 60 °C, seguido de 50 y 40 °C respectivamente, y de modo más evidente en el caso de las experiencias realizadas con destilado de la desodorización de aceite de girasol.

### 3.7.3- Efecto de la presión y la temperatura en la extracción de los compuestos de la fracción insaponificable del destilado de la desodorización de aceites vegetales

Los compuestos insaponificables hallados en el destilado del aceite de oliva fueron escualeno,  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol; se detectaron otros compuestos minoritarios, pero sin llegar a identificarlos (posiblemente  $\Delta^5$ -avenasterol o  $\Delta^7$ -estigmasterol). Estos mismos compuestos fueron los existentes en los destilados de aceite de girasol y sus extractos, habiendo más cantidad de esteroides y menos escualeno respecto a las muestras de oliva (tabla 3.7.3a). No se detectó la presencia de  $\beta$ -caroteno ni de  $\alpha$ -tocoferol en ninguna de las muestras analizadas tras la inyección de patrones. Las figuras 3.7.3a y b muestran los cromatogramas de DDO y DDG respectivamente.

Tabla 3.7.3.a Composición de la fracción insaponificable del destilado de la desodorización de aceites de oliva y girasol.

	DDO (%)	DDG (%)
Escualeno	40,96	26,51
Campesterol	29,19	22,56
Estigmasterol	n.d.	23,88
$\beta$ -Sitosterol	29,85	27,05

n.d. = no detectado



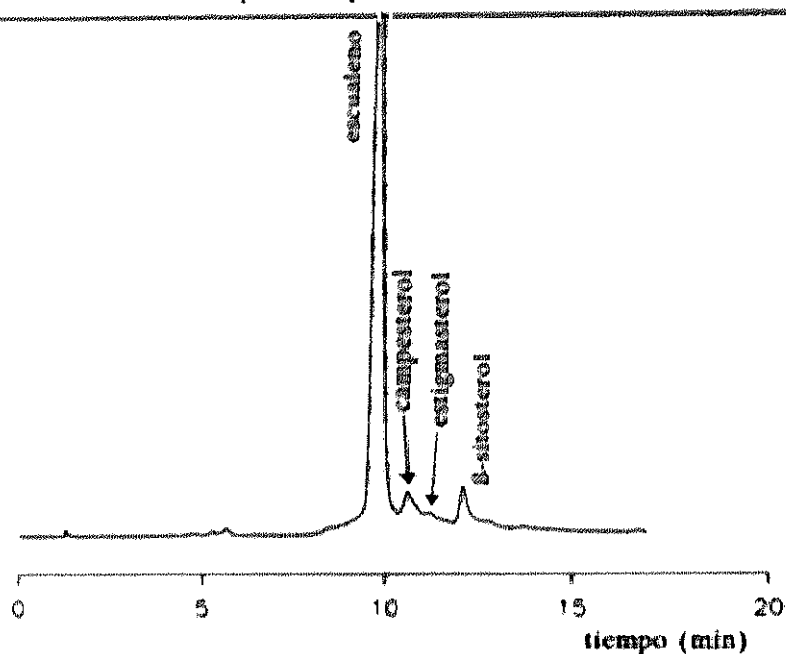


Figura 3.7.3a. Cromatograma por HPLC de los compuestos insaponificables del destilado de la desodorización de aceite de oliva.

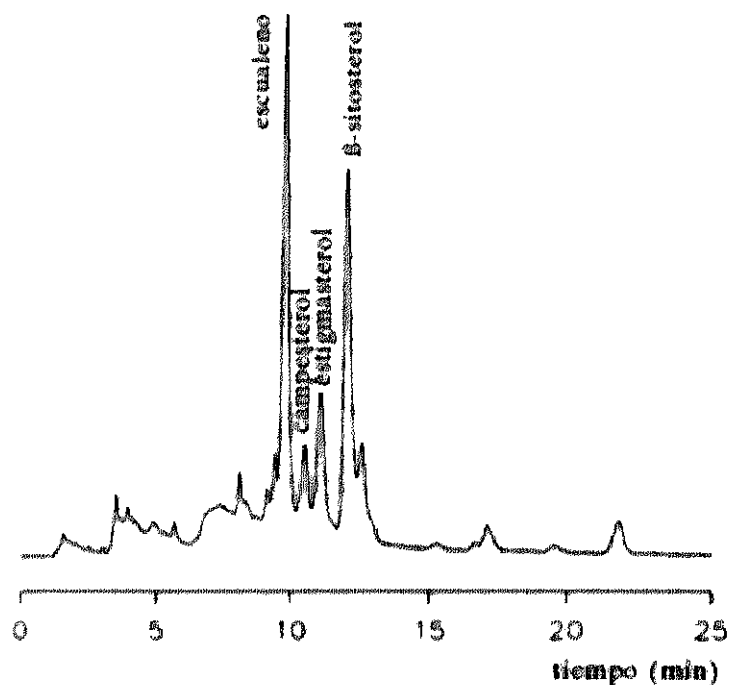


Figura 3.7.3b. Cromatograma por HPLC de la fracción insaponificable del destilado de la desodorización de aceite de girasol.

El escualeno es el componente mayoritario en la fracción insaponificable de ambos sustratos, si bien, el DDO posee la mayor cantidad. El segundo componente en porcentaje es el  $\beta$ -sitosterol. El campesterol es el esteroide que se encontró en menores proporciones en el DDG; sin embargo, no se detectaron cantidades cuantificables de estigmasterol en el DDO.

Las tablas 3.7.3(b-g) muestran las cantidades extraídas, expresadas en mg en cada extracto, de los compuestos insaponificables identificados para cada una de las condiciones estudiadas y con DDO y DDG como sustrato. Los análisis realizados a los extractos obtenidos a partir de DDO no detectaron estigmasterol en cantidades cuantificables, excepto en las condiciones de 30 MPa y 50 °C. Independientemente de la temperatura, a la presión de 10 MPa sólo se detectó la presencia de escualeno, a 15 MPa se extrajeron 1,14 mg de  $\beta$ -sitosterol a 40 °C y el campesterol comenzó a ser cuantificable a partir de las extracciones a 20 MPa y 50 °C. Las cantidades extraídas de escualeno, campesterol y  $\beta$ -sitosterol aumentaron al aumentar la presión de la extracción, siendo siempre mayoritaria la cantidad extraída de escualeno, seguida de  $\beta$ -sitosterol y campesterol. Los extractos obtenidos a partir del DDG también contuvieron escualeno como componente mayoritario, seguido de  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y escualeno. Sin embargo, la cantidad de esteroides extraída fue superior a la del DDO. El campesterol se extrajo cuantitativamente a partir de 25 MPa a las tres temperaturas. El estigmasterol y el  $\beta$ -sitosterol no se detectaron en los extractos obtenidos a 10 MPa y 50 y 60 °C.

Las figuras 3.7.3c (DDO) y d (DDG) representan la extracción de escualeno y de esteroides totales en función de la densidad del CO<sub>2</sub> y la temperatura de los tratamientos. Se observa que existe una mayor extracción de escualeno respecto a los esteroides a densidades inferiores a 0,70 g/mL, sobre todo en el caso del DDO, presentando la extracción de escualeno pocas variaciones en todo el rango de densidades (entre 1 y 3 mg, tanto para los extractos de DDO como de DDG). Los esteroides son pobremente extraídos a densidades inferiores a 0,70 g/mL; sin embargo, a densidades superiores

Tabla 3.7.3b. Composición (mg) de la fracción insaponificable de los extractos de DDO obtenidos a 40 °C.

Presión (MPa)	escualeno	campesterol	estigmasterol	$\beta$ -sitosterol
10	1,91	-	-	-
15	2,33	-	-	1,14
20	2,38	-	-	1,21
25	2,41	1,43	-	1,47
30	2,48	1,79		1,80

Tabla 3.7.3c. Composición (mg) de la fracción insaponificable de los extractos de DDO obtenidos a 50 °C.

Presión (MPa)	escualeno	campesterol	estigmasterol	$\beta$ -sitosterol
10	1,12	-	-	-
15	2,38	-	-	-
20	2,67	1,59	-	1,45
25	2,56	1,65	-	1,66
30	2,61	1,78	1,42	1,80

Tabla 3.7.3d. Composición (mg) de la fracción insaponificable de los extractos de DDO obtenidos a 60 °C.

Presión (MPa)	escualeno	campesterol	estigmasterol	$\beta$ -sitosterol
10	1,32	-	-	-
15	2,48	-	-	-
20	2,41	-	-	1,20
25	2,51	1,77	-	1,71
30	2,49	1,64	-	1,67

**Tabla 3.7.3e.** Composición (mg) de la fracción insaponificable de los extractos de DDG obtenidos a 40 °C.

<b>Presión (MPa)</b>	<b>escualeno</b>	<b>campesterol</b>	<b>estigmasterol</b>	<b><math>\beta</math>-sitosterol</b>
10	1,54	-	1,14	1,04
15	2,09	-	1,43	1,39
20	2,86	-	1,36	1,86
25	2,88	1,87	1,24	1,90
30	2,58	0,91	1,53	2,05

**Tabla 3.7.3f.** Composición (mg) de la fracción insaponificable de los extractos de DDG obtenidos a 50 °C.

<b>Presión (MPa)</b>	<b>escualeno</b>	<b>campesterol</b>	<b>estigmasterol</b>	<b><math>\beta</math>-sitosterol</b>
10	1,12	-	-	-
15	1,98	-	1,35	1,29
20	2,19	-	1,45	1,58
25	2,21	1,34	1,60	1,91
30	2,61	1,76	1,78	2,59

**Tabla 3.7.3g.** Composición (mg) de la fracción insaponificable de los extractos de DDG obtenidos a 60 °C.

<b>Presión (MPa)</b>	<b>escualeno</b>	<b>campesterol</b>	<b>estigmasterol</b>	<b><math>\beta</math>-sitosterol</b>
10	1,10	-	-	-
15	1,57	-	1,37	1,18
20	2,66	-	1,35	1,59
25	2,79	1,20	1,68	2,30
30	2,44	1,87	2,07	2,45

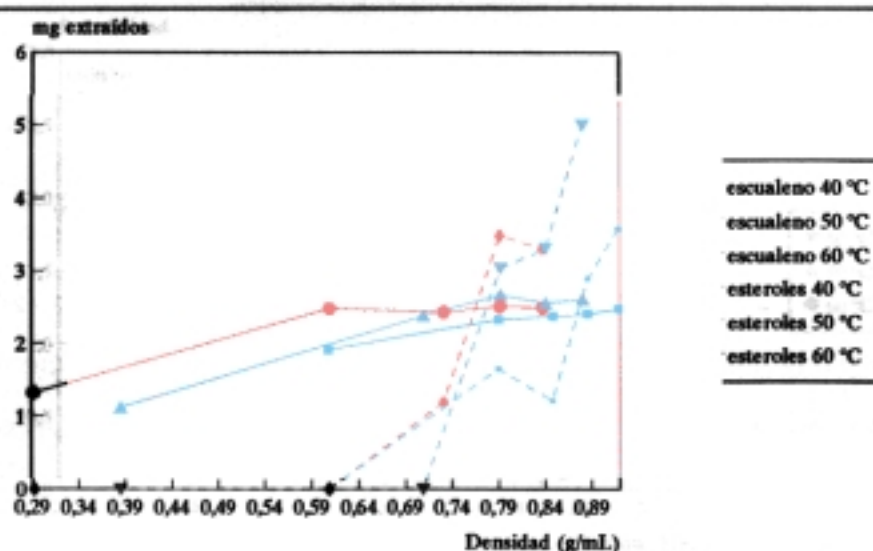


Figura 3.7.3c. Variación del porcentaje de escualeno y esteroides en el total de compuestos insaponificables de los extractos de los destilados de la desodorización de aceite de oliva.

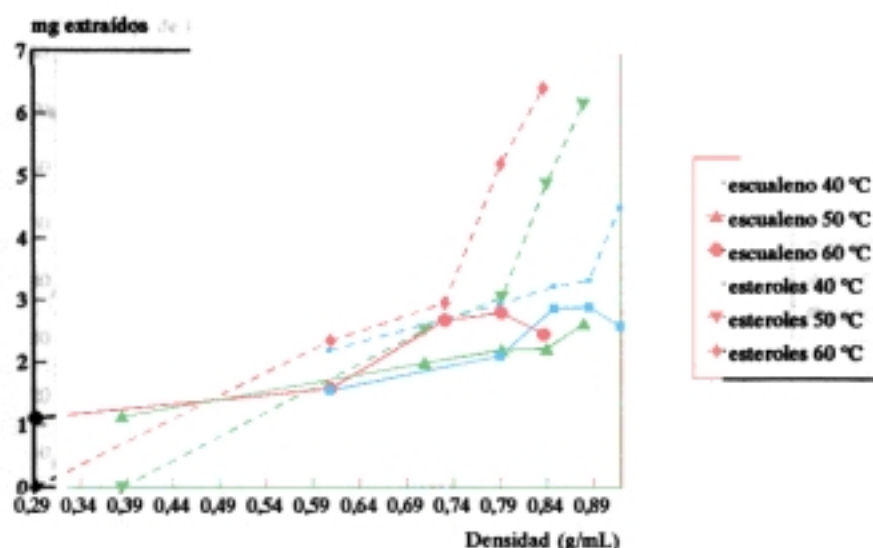


Figura 3.7.3d. Variación del porcentaje de escualeno y esteroides en el total de compuestos insaponificables de los extractos de los destilados de la desodorización de aceite de girasol.

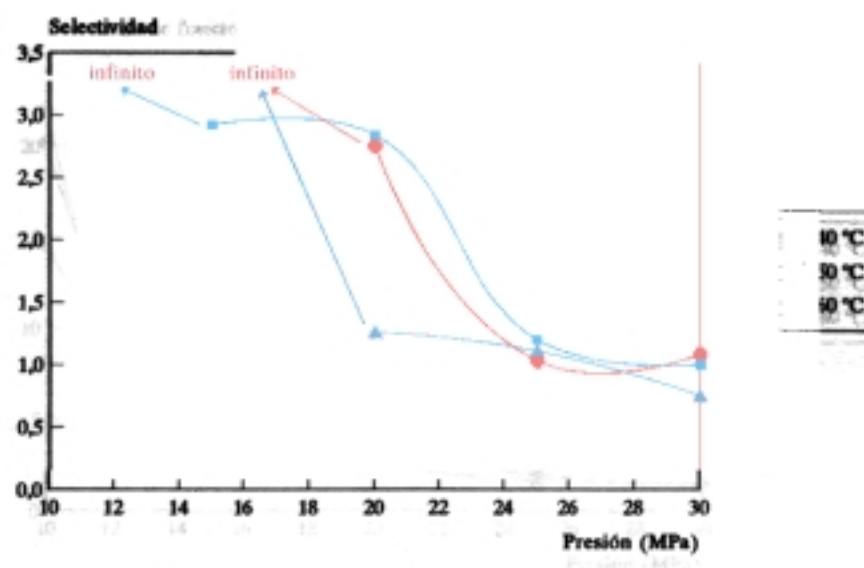


Figura 3.7.3e. Selectividad en la extracción de escualeno respecto al total de fracción insaponificable del DDO.

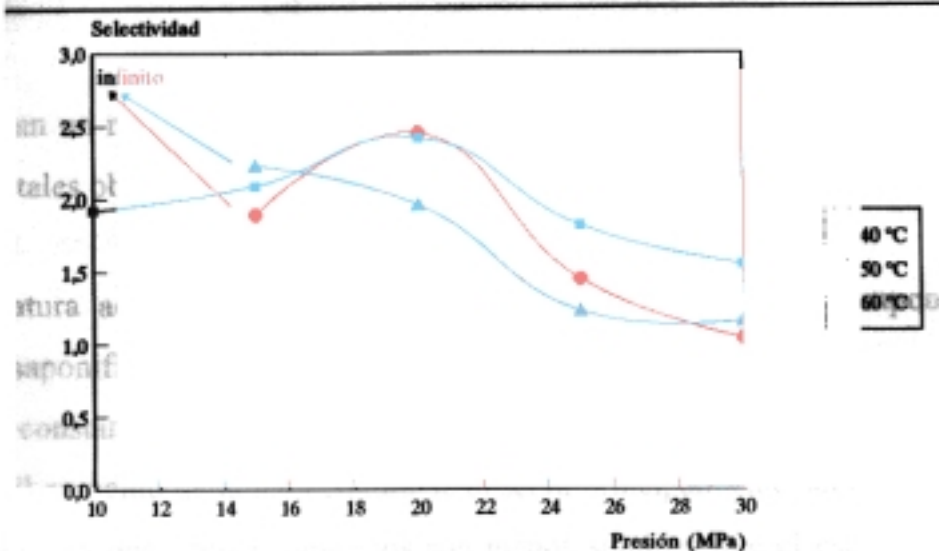


Figura 3.7.3f. Selectividad en la extracción de escualeno respecto al total de fracción insaponificable del DDG.

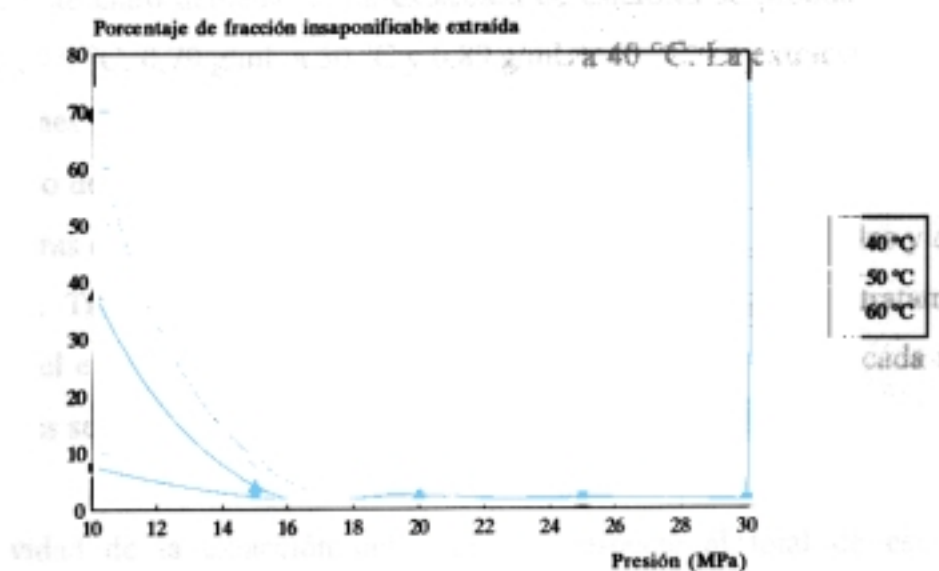


Figura 3.7.3g. Variación de la extracción de compuestos insaponificables totales en el DDO.

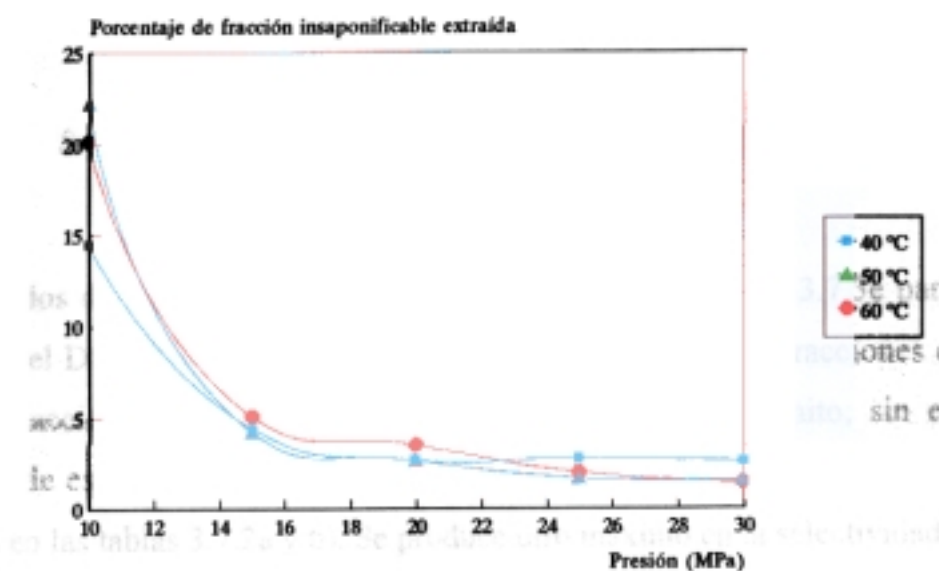


Figura 3.7.3h. Variación de la extracción de compuestos insaponificables totales en el DDG.

experimentan un rápido aumento en sus cantidades extraídas, elevándose la cantidad de esteroides totales obtenida por encima de la de escualeno.

La temperatura actúa de modo decisivo en la extracción de los componentes de la fracción insaponificable (figuras 3.7.3e y d). Se observa que el aumento de la temperatura a densidad constante aumenta las cantidades extraídas de escualeno y, más claramente, de esteroides. El aumento de la temperatura se observa principalmente sobre la extracción de los esteroides, ya que estos compuestos son menos solubles que el escualeno en el CO<sub>2</sub> supercrítico y el aumento de la volatilidad se constituye como factor primero en la extracción. Este claro aumento de la extracción de esteroides se produce a densidades de 0,74 g/mL a 60 °C, 0,79 g/mL a 50 °C y 0,89 g/mL a 40 °C. La extracción de esteroides en las condiciones de más bajas densidades también viene dada por las cantidades relativas de éstos en los destilados originales; de este modo, hay una mayor extracción de esteroides en las muestras de DDG debido a que se presentan en mayores cantidades y de escualeno en el DDO. También se observa el efecto de la temperatura del tratamiento en la extracción del escualeno, produciéndose máximos de extracción, para cada temperatura, en densidades semejantes a las de los esteroides, pero de modo menos marcado.

La selectividad de la extracción del escualeno respecto al total de esteroides puede definirse, de modo análogo al del colesterol respecto a los triglicéridos (apartado 2.5.7), como:

$$\text{Selectividad} = \frac{\text{relacion escualeno/esteroides en el extracto}}{\text{relacion escualeno/esteroides en origen}}$$

Los resultados de la selectividad quedan reflejados en las figuras 3.7.3e para el DDO y 3.7.3f para el DDG. La mayor selectividad se alcanza para las extracciones donde no ha habido extracción de esteroides, tendiendo los valores hacia infinito; sin embargo, las cantidades de escualeno extraído son muy bajas (los rendimientos en la extracción están recogidos en las tablas 3.7.2a y b). Se produce otro máximo en la selectividad a 20 MPa y

las temperaturas de 40 y 60 °C para la extracción de escualeno a partir de DDG, alcanzándose el valor de 2,5, que, sin embargo, es inferior al alcanzado en estas mismas condiciones partiendo de DDO (alrededor de 3). A presiones mayores de 20 MPa, la selectividad disminuye, llegando a valores de 1 - 1,5 en cualquiera de las tres temperaturas y sustratos, excepto a 25 y 30 MPa y 40 °C con DDG, que se mantiene superior (cercana a 2), debido a la menor extracción de esteroides en estas condiciones. Se puede concluir que las condiciones de mayor selectividad se alcanzan a las menores presiones y mayores temperaturas de estudio, pero se desaconseja el tratamiento por obtenerse un bajo rendimiento de extracto. Las condiciones más favorables son las que se producen al tratar DDO a una presión de 20 MPa y 40 °C. Si se parte de DDG con las mismas condiciones de tratamiento, la selectividad conseguida disminuye en 0,5 unidades.

Una gran parte de los componentes de los destilados de la desodorización de los aceites de oliva y girasol son ácidos grasos libres, y éstos también se extraen cuando se someten a un tratamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico, tal como se vio en los análisis realizados por RMN (apartado 3.5). Se calcularon las cantidades relativas de compuestos insaponificables (escualeno + esteroides) que se encontraban en los extractos por diferencia a partir de las masas de extracto obtenidas gravimétricamente. Los resultados quedan expresados en las figuras 3.7.3g para el DDO y 3.7.3h para el DDG.

Se aprecia que a 10 MPa y, en mucha menor medida, a 15 MPa los extractos se hayan enriquecidos en material insaponificable, aunque la cantidad extraída es demasiado baja. A presiones mayores, no parece haber variación en las bajas cantidades extraídas respecto a la de ácidos grasos libres. Las condiciones de 60 °C y 10 MPa fueron las más favorables en la reducción de la extracción de los ácidos grasos del DDO, seguido de la extracción a 50 y 40 °C por este orden. La explicación puede ser la baja volatilidad de los ácidos grasos libres frente a los esteroides y, sobre todo, al escualeno, que es el compuesto insaponificable que se encuentra en más cantidad en los destilados. La menor cantidad en que se encuentra el escualeno en el DDG frente al DDO puede ser la causa de que la



fracción insaponificable se encuentre en menor proporción en los extractos, aunque también se ha de tener en cuenta que el DDG tiene más cantidad de ácidos grasos insaturados que el DDO y que éstos son más fácilmente extraíbles por el CO<sub>2</sub> supercrítico. Las extracciones a que se somete el DDG proporcionan extractos menos ricos en compuestos insaponificables que el DDO y las diferencias conseguidas a las mayores temperaturas son menos evidentes. A partir de 20 MPa y para todas las temperaturas y sustratos del estudio se mantiene la relación entre compuestos saponificables/insaponificables, habiendo una composición semejante a la de las muestras en su origen.

#### ***Capítulo 4.***

***Aplicación del dióxido de carbono supercrítico a la inactivación  
de pectinesterasa en zumo de naranja.***

## 4.1- INTRODUCCIÓN. LOS CÍTRICOS

Los frutos cítricos representan una de las producciones más relevantes de la agricultura española y la más importante de las provincias de Murcia y Valencia. Predominan las variedades para el consumo en fresco, pero también tienen importancia las que pueden destinarse a las industrias para su transformación en zumos.

### 4.1.1- Composición de los cítricos

Los frutos cítricos, por su alto contenido en vitaminas y componentes minerales, constituyen, dentro de la alimentación humana, un producto de apreciado valor nutritivo. Entre dichas frutas, las naranjas son las más aceptadas; esto se debe fundamentalmente al sabor agradable debido a la relación azúcar/ácido, característica de ellas y a su notable valor alimenticio (Kefford, 1973).

Las partes fundamentales de los frutos cítricos son epicarpio o flavedo, mesocarpio o albedo y endocarpio o pulpa (figura 4.1.1).

El flavedo es la capa más externa del fruto. En ella se encuentran los plastidios y numerosos vesículas de aceite esencial. Los plastidios contienen clorofila en los frutos no maduros, y caroteno, xantofila y, en menor cantidad, criptoxantina cuando el fruto ha madurado.

El albedo es una capa blanca y parenquimatosa, compuesta por células de forma y tamaño irregular, con grandes espacios intercelulares llenos de aire.

La composición del albedo es la siguiente:

Agua	75 - 80%
Materia seca	20 - 25%

Azúcares	44%
Glucosa	63,5%
Fructosa	20,5%
Sacarosa	16%
Celulosa	33%
Sustancias pécticas	20%.

Los cítricos son, a continuación de las manzanas, la segunda fuente más importante de pectinas para la industria. Otros componentes del albedo son los glucósidos, hesperidina y limonina, este último importante por el problema de su intenso sabor amargo en la aceptación de los productos derivados de los cítricos.

Debajo de las capas que constituyen el flavedo y albedo está el endocarpio o pulpa, formado por una serie de segmentos. Cada segmento contiene una masa compacta de vesículas con zumo. La pulpa es la principal parte comestible del fruto y generalmente alcanza el 50- 80% del peso del fruto entero (Kefford, 1973).

Los sólidos disueltos en los zumos cítricos están compuestos principalmente por azúcares y ácidos. En las naranjas son los azúcares las componentes predominantes dentro de los sólidos disueltos. Los ácidos presentes en el zumo de naranja son el cítrico, que predomina, y el málico. También hay pectinas solubles que al exprimir la fruta quedan, en parte, incorporadas al zumo. Entre las enzimas existentes cabe destacar la pectinesterasa, cuya actividad es mayor en el endocarpio que en el albedo.

Por último, dentro del fruto están las semillas en las que cabe destacar un alto porcentaje de proteínas y de aceite.

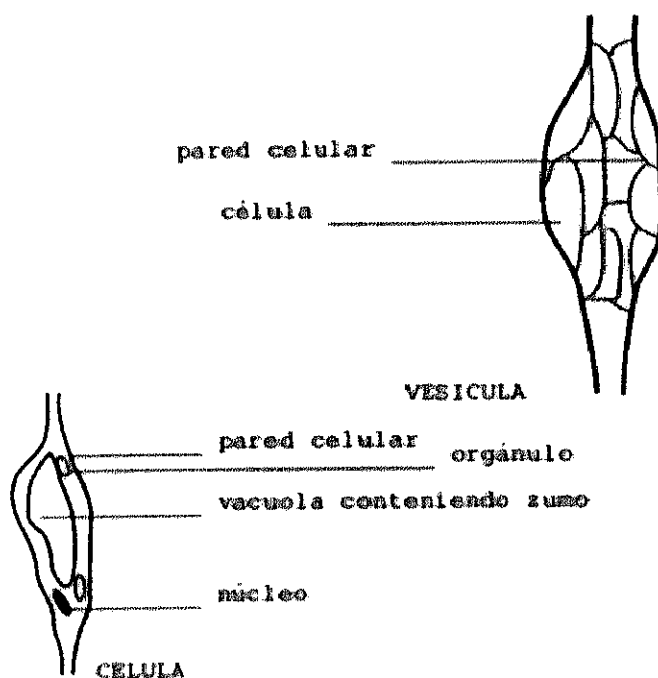
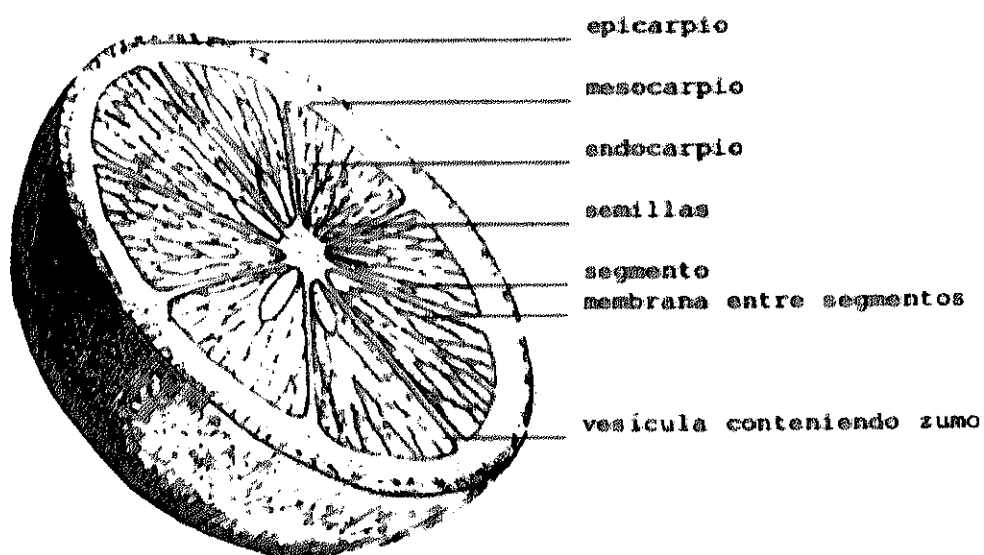


Figura 4.1.1. Morfología de la naranja.

#### 4.1.2- Sustancias pécticas

Las sustancias pécticas son un grupo complejo de polisacáridos ácidos que se encuentran en cantidades variables en el espacio intercelular de los tejidos de plantas superiores, particularmente en la lámina media. Estas sustancias se pueden clasificar del siguiente modo (Fogarty y Kelly, 1983):

las sustancias pécticas designan a aquellos glúcidos coloidales complejos de origen vegetal y que contienen una gran proporción de unidades de ácido anhidrogalaacturónico. Los grupos carboxílicos del ácido poligalaacturónico pueden estar esterificados parcialmente por grupos metilo o parcial o totalmente neutralizados por una o más bases,

la protopectina es el nombre dado a la sustancia que origina las sustancias pécticas, también de origen vegetal y que además es insoluble en agua,

los ácidos pectínicos definen a los ácidos poligalaacturónicos que no contienen más que una pequeña parte de ésteres metílicos. Bajo las condiciones adecuadas forman geles con azúcares y ácidos; si el contenido en metoxilos es bajo pueden formarse geles con algunos iones. Las sales de los ácidos pectínicos pueden ser neutras o ácidas.

la pectina o las pectinas se refieren a los ácidos pectínicos solubles en agua, pueden contener diferentes proporciones de ésteres metílicos y grado de neutralización. También pueden formar geles.

el ácido péctico es el ácido poligalaacturónico coloidal esencialmente libre de ésteres metílicos. Los pectatos son sus sales derivadas.

#### 4.1.2.1- Estructura y composición

Los polisacáridos pécticos son ácidos poligalacturónicos, formados por ácido galacturónico con enlaces  $\alpha$ -1,4 (que potencian la formación de coloides) y ramificaciones de otras unidades no urónicas, como rhamnosa, arabinosa, galactosa, xilosa y fucosa. La figura 4.1.2.1 representa la estructura general de las sustancias pécticas (Macmillan y Sheiman, 1974).

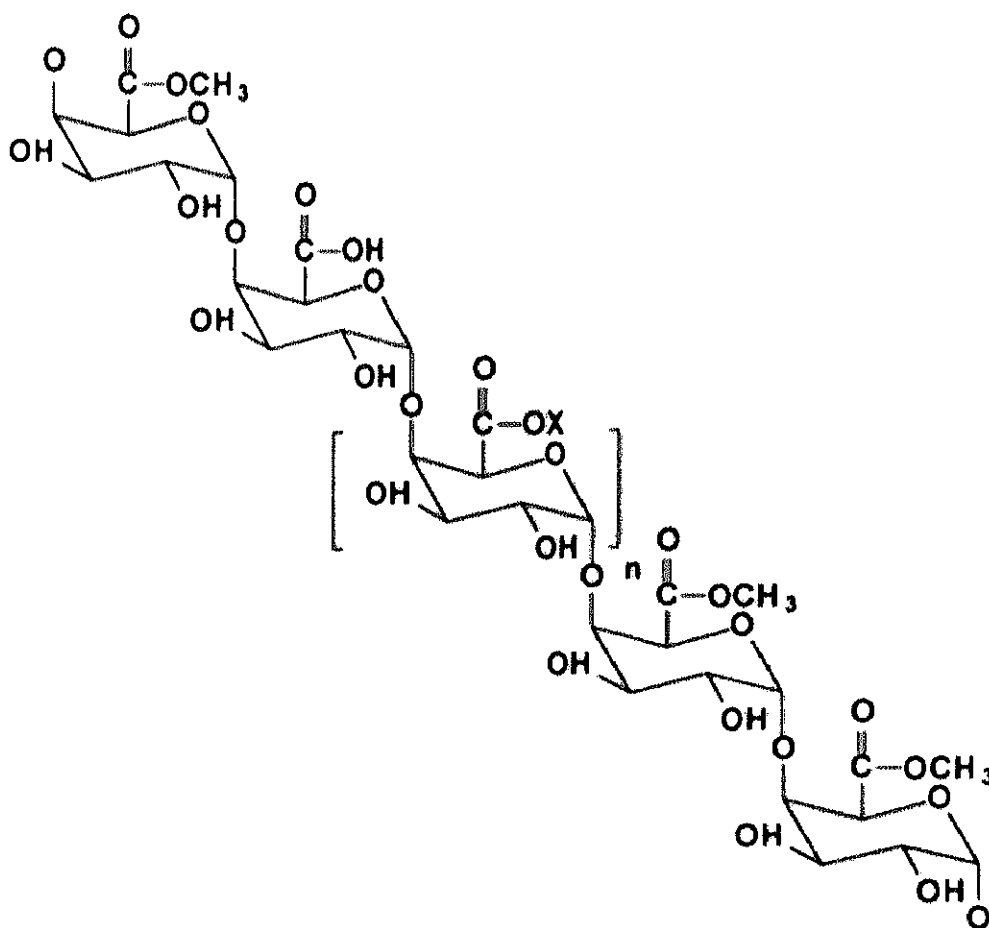


Figura 4.1.2.1. Estructura de las sustancias pécticas. X = H ó CH<sub>3</sub>.

El número de esterificaciones de los grupos carboxílicos a metanol es variable y depende también de la especie vegetal en cuestión. Pueden aparecer grupos acetilos en C2 y C3,

afectando a las propiedades de gelificación. El peso molecular, en el caso de la naranja, está alrededor de 40000 y 50000.

La pérdida de solubilidad puede producirse por las siguientes razones:

1. unión a iones polivalentes como los de calcio, magnesio y hierro, que causan la precipitación de las sustancias pécticas poco esterificadas y reducen la solubilidad de las altamente esterificadas,
2. unión de los grupos carboxílicos a los hidroxilos de otros constituyentes celulares, como la celulosa o hemicelulosas,
3. enlaces iónicos entre los carboxilos y los grupos básicos de las proteínas,
4. uniones más débiles con otros constituyentes celulares,
5. entrelazamiento mecánico entre sí o con polímeros de la pared celular.

#### 4.1.2.2- Ocurrencia y propiedades

Las sustancias pécticas se localizan en la lámina media, la capa de unión intercelular y la pared primaria de los vegetales (Rombouts y Pilnik, 1980). Su síntesis comienza en las primeras etapas de crecimiento y disminuye posteriormente. La textura de los frutos depende, en parte, de la cantidad de sustancias pécticas. El fruto verde presenta protopectinas, insolubles, que se transforman en solubles durante la maduración, suavizando la textura. La facilidad de disolución en agua empeora al aumentar la longitud de la cadena polisacárida, pero en caso de producirse una solubilización se forman disoluciones altamente viscosas, dependiendo del peso molecular, grado de esterificación, fuerza iónica, pH, temperatura y concentración.



La siguiente tabla muestra el contenido de sustancias pécticas en algunos frutos:

Fruto	Sustancias pécticas (%)
Uva	0,2-1,0
Manzana	0,5-1,6
Pomelo	1,6-4,5
Limón	3,0-4,0
Limón (semillas)	6,0
Limón (corteza)	32,0
Limón (pulpa)	25,0
Naranja (corteza)	20,0
Naranja (membrana)	29,0
Naranja (vesículas)	16,0

En zumos de cítricos, a diferencia de otros zumos, su naturaleza turbia se considera una característica deseable. La turbidez propia del zumo no se presenta en el zumo existente en las vacuolas celulares, sino que proviene de la ruptura de las células durante el proceso de extracción. En este proceso, compuestos de alto peso molecular de los organelos y citoplasma quedan suspendidos en el zumo junto con fragmentos de membrana y material de origen péctico. Toda esta suspensión coloidal proporciona la turbidez al zumo y se compone de un 30% de proteínas, 20% de hesperidina, 15% de celulosa y hemicelulosa y 5% de pectina (Bennet, 1987), siendo el 30% restante aún desconocido. Sin embargo, el efecto de la pectina sobre la turbidez es el más importante (Kimball, 1991), ya que su insolubilización también puede arrastrar otros compuestos además de considerar su gran peso molecular (hasta 100.000 ó 200.000).

### 4.1.3- Enzimas pécticos

La abundancia de sustancias pécticas en los vegetales ha creado diferentes sistemas enzimáticos capaces de degradar estas estructuras. Éstos se diferencian tanto por su mecanismo de acción como por su distribución. Los enzimas pécticos se producen por plantas y microorganismos, pero no por células animales. Los enzimas pécticos se clasifican en dos principales grupos (Rombouts y Pilnik, 1980):

1. enzimas que desesterifican mediante hidrólisis, son las pectinesterasas (también llamadas pectasas y pectin-metilesterasas). La desesterificación de la pectina produce metanol y ácido péctico (figura 4.1.3a).

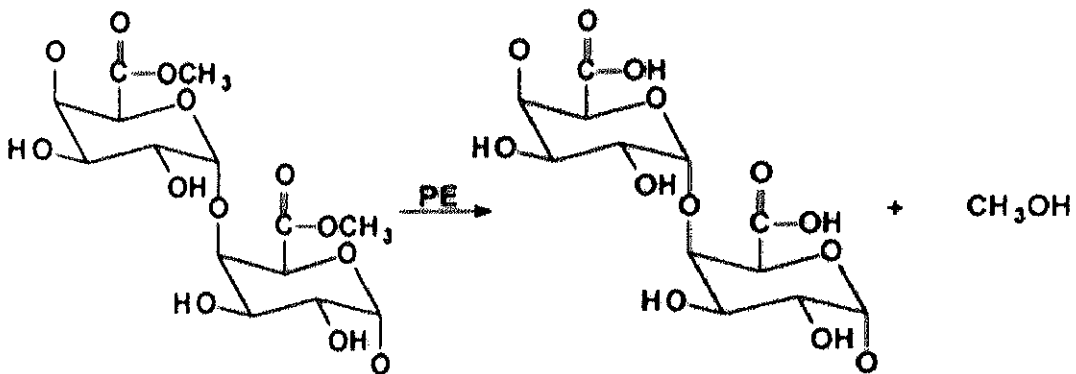


Figura 4.1.3a. Reacción de la pectinesterasa (PE).

2. enzimas que rompen la cadena poligalacturónica, son las despolimerasas. Estos enzimas producen la rotura de los enlaces glicosídicos por hidrólisis (hidrolasas, figura 4.1.3b) o por  $\beta$ -eliminación (liasas, figura 4.5.1.3c).

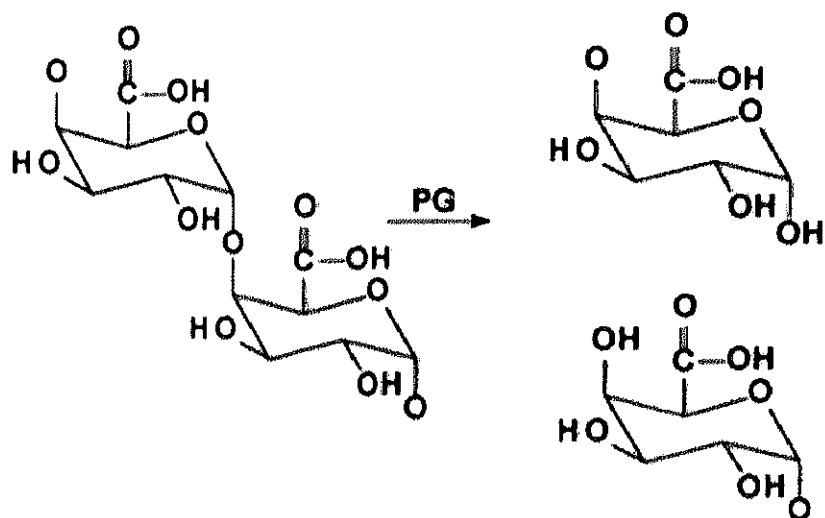


Figura 4.1.3b. Reacción de las hidrolasas (poligalacturonasas, PG).

Las poligalacturonasas tienen a los pectatos como mejor sustrato para su acción, mientras que la actividad disminuye al aumentar el grado de esterificación.

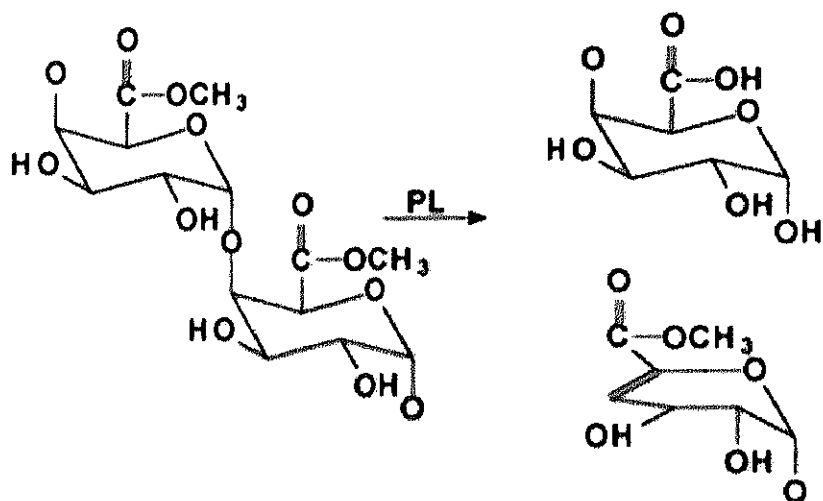


Figura 4.1.3c. Reacción de las liasas (pectín-liasa, PL).

#### 4.1.4- Pectinesterasas en cítricos

Las pectinesterasas son biosintetizadas por plantas superiores, hongos y algunas bacterias. Las de frutos son las mejor estudiadas, encontrándose múltiples formas moleculares e isoenzimas. La acción pectinesterásica fue ya estudiada por Frémy en 1840, que observó que al adicionar zumo de zanahoria a una solución de pectina se formaba un gel. El gel se debía a la hidrólisis de los ésteres de la pectina seguida de la precipitación como pectato cálcico.

Los cítricos, junto con el tomate, son los frutos que presentan mayores cantidades de pectinesterasa (Versteeg y col., 1978). El ablandamiento de los tejidos del fruto durante la maduración y el almacenamiento se ha asociado con la acción de la pectinesterasa, más que a la acción de los otros enzimas pécticos.

La calidad de los zumos de cítricos depende de las reacciones enzimáticas que ocurren no sólo durante el desarrollo y maduración del fruto, sino también durante el procesado y almacenamiento del zumo. Cuando un zumo se obtiene por expresión del cítrico, los enzimas son liberados de los lugares donde normalmente se encuentran. Varios de estos enzimas catalizan reacciones adversas que afectan al sabor y apariencia del zumo, en general a su calidad. La pectinesterasa es el enzima que más afecta al empeoramiento de la calidad del zumo.

Al comienzo del desarrollo de la industria de procesado de zumos de cítricos se reconoció la clarificación en zumos embotellados y enlatados como resultado de la acción de pectinesterasa que no había sido inactivada por medio de la pasteurización, normalmente realizada a 70 °C 1 min (Ting y Rouseff, 1986).

La pectinesterasa se encuentra asociada con elementos estructurales del fruto. Según Bruemmer (1980) no existía actividad en el zumo filtrado, pero encontró 58, 44 y 28 unidades de actividad pectinesterásica por kg de tejido seco en flavedo, albedo y pulpa respectivamente. Si nos atenemos al zumo, la máxima actividad se encontró en los restos de

vesículas (pulpa) y la menor en el sobrenadante del zumo centrifugado, siendo la actividad del zumo proporcional a su contenido en pulpa (Rouse, 1951; Rouse y col., 1954). Jansen y col. (1960) mostraron que la pectinesterasa está unida a las paredes celulares formando un complejo enzima-sustrato con la pectina. Conforme la pectinesterasa actúa sobre la pectina, desesterificándola, el enzima va pasando al medio desde la pared hasta llegar a un equilibrio. Sin embargo el enzima soluble es un 20% más activo que el unido a la pared.

#### 4.1.4.1- Isoenzimas

Actualmente se conocen varias formas de pectinesterasa de cítricos que difieren en sus propiedades cinéticas y termoestabilidad (Versteeg, 1979). Algunas de las irregularidades para la inactivación térmica de la pectinesterasa y la estabilidad de la turbidez pueden atribuirse a la acción de diferentes formas de pectinesterasa.

Se han encontrado formas múltiples de pectinesterasa de cítricos. Evans y McHale (1978) caracterizaron dos isoenzimas en naranjas y limones, el primero de ellos lo encontraron en la piel y el segundo en las vesículas y carpelos. Versteeg y col. (1978) también partieron de pulpa y piel de naranjas, llegando a caracterizar dos isoenzimas (PEI y PEII). Los trabajos de Rombouts y col. (1982) llegaron a aislar PEII únicamente de la piel, pero PEI se encontró también en carpelos y vesículas. Ambos tenían un peso molecular de 36200, pero PEI era dos veces más activo. PEI tenía una actividad óptima a pH 7,6 y PEII a 8,0. Posteriormente, Versteeg (1979) aisló un tercer isoenzima (HM-PE) y comprobó que era más termoestable que PEI y PEII, de 54000 de peso molecular y con un 5% de la actividad total. También pudo separar HM-PE en tres fracciones, siendo el isoenzima HM-PEII el que contenía el 85% de la actividad. En total se llegaron a aislar 12 isoenzimas de pectinesterasa en zumo de naranja, si bien, PEI y PEII mostraron más del 80% de la actividad (60% y 30% respectivamente).

#### 4.1.4.2- Estabilidad de los isoenzimas

La actividad pectinesterásica de naranja se pierde solamente en un 15% tras dos años si se conserva a 4 °C en NaCl 0,1M y tampón fosfato a pH 7,5 (Versteeg, 1979). A 30 °C PEI era estable 24 h a pH 4 y 7, pero PEII sólo lo era durante 6 h a pH 4. Sin embargo, HM-PE era activo tras 15 días de almacenamiento.

Experiencias sobre la estabilidad térmica llegaron a la conclusión de que a pH 4, PEII era la menos estable al inactivarse a 55 °C. PEI se inactivaba a 65 °C y HM-PE a 85 °C. Según Kimball (1991), la temperatura de pasteurización normalmente empleada para el zumo de naranja (alrededor de 66 °C) ha de elevarse hasta 88 °C durante un tiempo no inferior a 10-15 s para evitar la acción de los enzimas; en el zumo de limón la temperatura puede bajarse hasta 74 °C por su alto contenido en ácidos. Según Versteeg (1979), PEI y PEII poseen el 90% del total de la actividad clarificante del zumo a 30 °C, sin embargo, a 5 °C PEI solamente conservaba un 1% de su actividad a 30 °C y no se observaba una clarificación significativa hasta la cuarta semana, excepto por la causada por la HM-PE, que sí permanecía activa. Según Ting y Rouseff (1986) la temperatura de pasteurización ha de elevarse hasta 90 °C 10 s o temperaturas mayores con menores tiempos. Seymour y col. (1991a y b) purificaron y caracterizaron dos formas de pectinesterasa, la termoestable (TS-PE) y la termolábil (TL-PE) distinguiéndose por su inactivación a 70 °C durante 5 min. Según Snir y col. (1996) la inactivación de la TL-PE se consigue a partir de 2 min, no variando la actividad total en calentamientos de tiempos menores o iguales a 10 min.

Wicker y Temelli (1988) estudiaron la cinética de inactivación de la pectinesterasa del zumo de naranja cuando era sometida a un tratamiento térmico, observando un comportamiento no lineal debido a la existencia de fracciones de enzima con diferente termoestabilidad, si bien la velocidad de inactivación podía acomodarse a una cinética de orden 1. Sin embargo, anteriormente, Marshall y col. (1985) observaron que la cinética de inactivación del enzima dependía de la cantidad de sólidos solubles en el zumo, cuantificada como °Brix, entre 10 - 35 °Brix la cinética era de primer orden, pero por encima de 40 °Brix la cinética se tornaba

sigmoidal. Los estudios sobre la inactivación de la pectinesterasa se han realizado en su mayoría sobre tratamientos térmicos a presión atmosférica, incluso se han realizado estudios sobre la inactivación con CO<sub>2</sub> supercrítico; sin embargo, no se han encontrado referencias que traten de acomodar los resultados de inactivación a una cinética cuando los tratamientos se realizan mediante la técnica del CO<sub>2</sub> supercrítico.

#### 4.1.4.3- Estabilidad de la turbidez y actividad pectinesterásica

Versteeg (1979) concluyó que HM-PE era el isoenzima responsable de la desestabilización del zumo de naranja durante el almacenamiento y que la estabilización de la turbidez se consigue por calentamiento a 90 °C 1 min para inactivar este isoenzima. Sin embargo, la alta temperatura del procesado produce sabores desagradables en el zumo (Kew y Veldhuis, 1961). Además, aunque representen las menores fracciones de la actividad pectinesterásica del total del fruto (Rombouts y col., 1982; Versteeg, 1979; Seymour, 1991a; Walker, 1992), estas formas son las más activas en zumos mantenidos a 4 °C, siendo necesaria su inactivación (Versteeg, 1980; Seymour, 1991b). También, Versteeg y col. (1980) advierten de la posible desestabilización de la turbidez a pesar del almacenamiento a temperaturas bajo cero pero superiores a -20 °C, incluso en concentrados.

## **4.2- MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***4.2.1- Preparación de la muestra***

Previamente a cada tratamiento, las naranjas procedentes del comercio (4 Kg) se exprimían en un exprimidor doméstico Braun Citromatic de 50 Hz. El zumo se hizo pasar por un tamiz de 1 mm de luz de malla para eliminar fragmentos groseros de pulpa y evitar la aparición de obstrucciones en la conducciones del equipo de tratamiento supercrítico.

Parte del zumo obtenido se utilizaba para realizar los diferentes tratamientos. El resto del zumo se conservaba a 4 °C y se utilizaba como control para los posteriores análisis a realizar en el mismo día. Las muestras se congelaron a -20 °C para prolongar su conservación en el caso de que fuera necesario.

#### *4.2.2- Efecto sobre el zumo de naranja del tratamiento con dióxido de carbono en condiciones supercríticas*

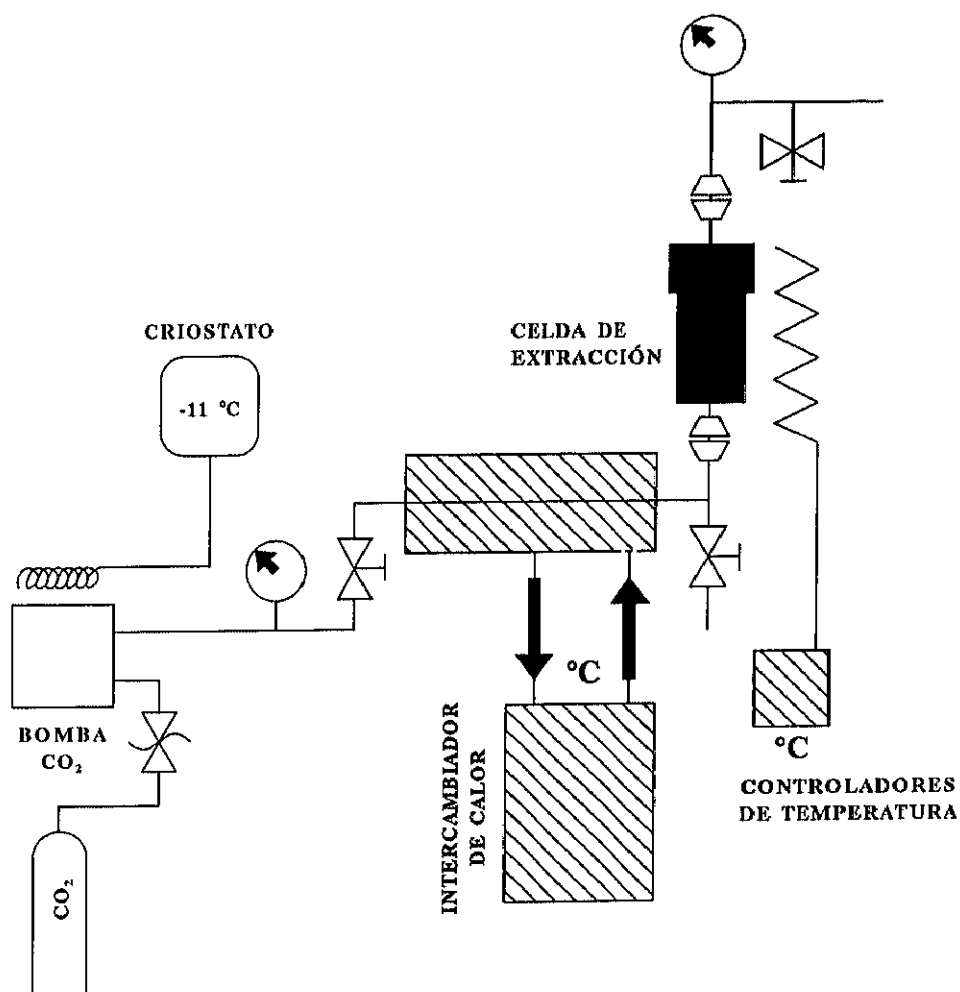
Los tratamientos se llevaron a cabo utilizando el extractor de fluidos supercríticos semipreparativo LDC Analytical modificado (apartado 2.4.2). Se realizaron en modo estático y sin obtención de extracto. La figura 4.2.2 representa el equipo tal como fue modificado para los tratamientos del zumo de naranja. La celda fue la comúnmente utilizada para la extracción a partir de sólidos con las válvulas cerradas para la realización de tratamientos estáticos.

El zumo se sometió a las siguientes condiciones de temperatura, presión y tiempo:

- 40 y 60 °C,
- 6,9; 20,7 y 34,5 MPa,
- 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 minutos,
- 120 y 180 min a 34,5 MPa y 60 °C con el fin de someter la pectinesterasa a las condiciones de inactivación más severas.

Posteriormente se realizaron los análisis junto con el control, que fue el zumo recién exprimido sin someter al tratamiento supercrítico.





**Figura 4.2.2. Esquema del extractor supercrítico semipreparativo para el tratamiento de zumo de naranja**

#### 4.2.3- Determinación de la actividad pectinesterásica

La actividad pectinesterásica (APE) de los zumos controles y los sometidos a condiciones supercríticas se determinó por valoración (Rouse y Atkins, 1955). Para evitar errores por exceso en la valoración, el dióxido de carbono de la muestra se eliminaba bajo corriente de N<sub>2</sub>.

Se utilizó como sustrato 30 mL de una solución de pectina de cítricos altamente metoxilada (Sigma Chemical Co.) al 1% en solución acuosa con NaCl 0,1M y NaN<sub>3</sub> 1mM, agitada constantemente a 30 °C. El pH de esta solución se ajusta a 7,50 (óptimo de actuación del enzima) con disoluciones de NaOH y Hcl. La adición de la muestra (2-5 mL) provoca la liberación de metanol y grupos carboxílicos procedentes del sustrato en exceso. La APE se calcula a partir del volumen de NaOH 0,01N consumido para neutralizar los grupos carboxílicos producidos en un tiempo de 5 min. Se define 1 UPE (unidad de actividad pectinesterásica) como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de grupos carboxílicos por minuto en las condiciones estándar de ensayo. La APE se suele dar como UPE por unidad de volumen de muestra en mL y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$UPE/\text{mL} = \frac{(\text{mL NaOH}) (N \text{ NaOH}) (10^3)}{(\text{min}) (\text{mL zumo})} \quad (4.1)$$

#### 4.2.4- Medida de la turbidez

El zumo se sometió a las siguientes condiciones:

- temperaturas de 40, 50 y 60 °C,
- presiones de 6,9; 13,8; 20,7; 27,6 y 34,5 MPa.

El tiempo de tratamiento fue de 1 h. Tras el tratamiento el zumo era extraído con la presión propia de la celda. También se realizaron tratamientos en los que se despresurizó la celda previamente a la extracción del zumo.

En el mismo equipo se realizaron tratamientos a 40, 50 y 60 °C durante 1 h a presión atmosférica para la realización de controles térmicos. También se sometió el zumo a presión subcrítica (5,5 MPa) y temperatura ambiente durante un tiempo mínimo como control en la variación de turbidez sin inactivación de pectinesterasa.

La medición de la turbidez se realizó según el método de Versteeg y col. (1980). El zumo se centrifugó a 320×g durante 10 min. El sobrenadante se vertió en cubetas de 1 mm de espesor y se midió la absorbancia a 660 nm frente a un blanco de agua destilada en un espectrofotómetro Beckman modelo DU®-70.

El cálculo de la precisión del método de medida se realizó a través del cálculo de la desviación estándar relativa de triplicados de muestras. Se realizaron quintuplicados durante dos días de una misma muestra ya centrifugada para comprobar la estabilidad de la turbidez de los preparados.

#### ***4.2.5- Medida del color***

El color es uno de los atributos de calidad más a considerar en la apariencia o aspecto de los alimentos. En concreto, se ha observado anteriormente que el color de los zumos de naranja sufre variaciones al ser sometido a tratamientos supercríticos, si bien, estos resultados son difícilmente interpretables (Balaban y Arreola, 1991).

El color se midió según el método de Gonzáles y col. (1990). Previamente se centrifugó el zumo a 320×g durante 10 min. Se realizaron los espectros de absorción UV/VIS de los

sobrenadantes en el espectrofotómetro, acoplado a un ordenador con velocidad de registro de 2400 nm/min, equivalente a registrar un dato de absorbancia cada 2 min. Las medidas se realizaron por quintuplicado para el estudio de su precisión. El método de Gonzáles y col. se fundamenta en el la CIE, mejorando el tiempo de análisis de las muestras. Se realiza un registro y procesamiento de datos con ordenador, se consigue el control de un alto número de muestras en un tiempo corto y, además, el análisis de los atributos cromáticos de los muestras estudiadas es más eficiente, cómodo, preciso, exacto que otros utilizados anteriormente y permite un mejor entendimiento de los resultados. Este método ha sido utilizado con éxito por Gonzáles (1990), Gonzáles y col. (1990), y Gómez-Cordovés y González-SanJosé (1995).

Posteriormente se calcularon los parámetros cromáticos, que son la intensidad, tonalidad, brillantez, longitud de onda dominante y pureza de cada muestra. Estas variables se definen de la siguiente manera (Gonzáles, 1990):

intensidad, es el área entre la curva de absorbancias y el eje de longitud de onda desde 400 hasta 600 nm,

tonalidad, es la pendiente de la curva de absorbancias en el rango de 450 a 500 nm, por regresión lineal simple,

brillantez, es la cantidad de gris que contiene un color, dentro de una escala comprendida entre el negro y el blanco,

longitud de onda dominante, es el matiz de color tal como rojo, verde, azul, etc.,

pureza, corresponde a la variación que tiene un color cuando al permanecer invariable el tono se va aclarando paulatinamente.

#### **4.2.6- Efecto del almacenamiento sobre la turbidez y color**

Se llevó a cabo un estudio de la variación de la turbidez y del color durante el almacenamiento de zumos sometidos a los siguientes tratamientos:

1. almacenamiento a 4 °C,

- control (zumo no tratado),
- 27,6 MPa y 40 °C durante 1 h, extrayendo el zumo a presión,
- 27,6 MPa y 50 °C durante 1 h, extrayendo el zumo a presión,

2. almacenamiento a temperatura ambiente,

- control (zumo no tratado),
- 34,5 MPa y 60 °C durante 1 h, extrayendo el zumo a presión,
- 5,5 MPa a temperatura ambiente durante el tiempo mínimo necesario para su posterior extracción a presión.

### **4.3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.3.1- Efecto del tratamiento con dióxido de carbono supercrítico sobre la inactivación de pectinesterasa de zumo de naranja**

El estudio de la precisión del método de valoración de la APE, tras realizar valoraciones por quintuplicado, ofreció valores de desviación estándar relativa <9%.

La tabla 4.3.1 presenta los resultados de APE de los zumos antes y tras el tratamiento supercrítico para las condiciones estudiadas.

**Tabla 4.3.1.** Actividad pectinesterásica (UPE/mL) de los zumos antes y tras los tratamientos con dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>).

tiempo (min)	40 °C			60 °C		
	6,9 MPa	20,7 MPa	34,5 MPa	atmosf.	6,9 MPa	34,5 MPa
0	1,21	1,20	1,19	1,15	1,20	1,20
1	1,05	1,20	1,15	0,80	0,30	0,25
10	1,10	1,25	0,90	0,30	0,30	0,25
15	1,10	1,15	0,95	0,30	-	0,25
20	1,05	1,00	0,90	0,30	0,30	0,25
30	1,00	0,80	0,75	0,30	0,25	0,20
45	1,00	0,70	0,60	0,30	0,25	-
60	0,75	0,50	0,35	0,30	0,25	0,15
90	0,65	0,45	-	-	0,20	0,15
120	0,55	-	-	-	-	0,20
180	-	-	-	-	-	0,20

Se observó que los tratamientos a 60 °C fueron los más enérgicos; sin embargo, también se observó que la presión era un factor a tener en cuenta, ya que los tratamientos a presión atmosférica a 60 °C sufrieron una menor inactivación de la pectinesterasa. A presión atmosférica y 60 °C la inactivación es más lenta que a cualquiera de las presiones de estudio, ya que al cabo de 1 min la actividad se ha reducido solamente a 0,80 UPE/mL, mientras que en los tratamientos supercríticos llega a ser de 0,20 UPE/mL, pudiéndose considerar valores de  $\pm 0,05$  como error del propio método de medida. Los tratamientos realizados a 60 °C dejaron una actividad residual de  $0,20 \pm 0,05$  UPE/mL causada por la pectinesterasa termorresistente (la inactivación se consiguió totalmente en ensayos realizados a 90 °C y presión atmosférica).

En los estudios realizados a 40 °C se pudo adecuar al orden cero la cinética de inactivación mediante análisis por regresión lineal simple, siguiendo la ecuación:

$$APE / mL = APE_0 / mL - Kt \quad (4.2)$$

donde:  $APE_0$  = APE inicial expresada como UPE,

$K$  = constante de velocidad expresada en UPE/(mL·min),

$t$  = tiempo en minutos.

Los resultados obtenidos para la cinética de inactivación fueron los indicados a continuación:

- 40 °C y 6,9 MPa:  $APE/mL = -0,00509t + 1,1388$ ,  $r^2 = 0,9210$ ;
- 40 °C y 20,7 MPa:  $APE/mL = -0,01033t + 1,2401$ ,  $r^2 = 0,9023$ ;
- 40 °C y 34,5 MPa:  $APE/mL = -0,14204t + 1,20501$ ,  $r^2 = 0,9715$ .

Se puede observar, también, el efecto dependiente de la presión sobre la inactivación pectinesterásica, ya que la constante de velocidad de inactivación aumenta progresivamente (en valor absoluto) al aumentar la presión del tratamiento, siendo la alcanzada a 20,7 MPa el doble que a 6,9 MPa, y a 34,5 MPa llega a triplicarse. Éste un hecho que satisface las expectativas para conseguir efectos de inactivación con empleo de menores temperaturas de calentamiento. Sin embargo, los tratamientos no son tan drásticos como los que se realizaron a 60 °C, independientemente de la presión utilizada.

#### *4.3.2- Efecto del tratamiento con dióxido de carbono supercrítico sobre la modificación de la turbidez del zumo de naranja*

Los resultados tras la medición de la turbidez de una misma muestra durante dos días se presentan en la figura 4.3.3a (del apartado 4.3.3). Se observa que la turbidez de los zumos tras la centrifugación es muy estable tras dos días de mediciones, ya que la desviación estándar relativa conseguida es <1,5%, del mismo modo que esta turbidez no impide una muy buena repetibilidad de los resultados. La razón de la estabilidad se explica ya que tras la

centrifugación disminuye la concentración de pectinesterasa en el sobrenadante, disminuyendo su actividad.

La precisión del método al realizar triplicados de un zumo ofreció un valor de desviación estándar relativa <1,5%, siendo un método muy preciso (figura 4.3.3b, del apartado 4.3.3).

Se observó un aumento generalizado de la turbidez del zumo de naranja tras los tratamientos supercríticos. El aumento no se producía en los tratamientos térmicos a presión atmosférica. La tabla 4.3.2 presenta los resultados de absorbancias a 660 nm de los zumos antes y tras los tratamientos en las condiciones indicadas. En todos estos casos el zumo se extrajo a presión tras finalizar el tratamiento. La figura 4.3.2 representa la variación de turbidez calculada del siguiente modo:

$$\Delta T = \frac{T_f - T_i}{T_i} \quad (4.3)$$

siendo:

$\Delta T$  la variación de la turbidez,

$T_i$  la turbidez antes del tratamiento,

$T_f$  la turbidez tras el tratamiento,

**Tabla 4.3.2.** Turbidez ( $A_{660}$ ) de los zumos antes y tras los tratamientos con dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>).

Presión (MPa)	Temperatura (°C)					
	40		50		60	
	control	SC-CO <sub>2</sub>	control	SC-CO <sub>2</sub>	control	SC-CO <sub>2</sub>
atmosférica	0,0359	0,0381	0,0359	0,0417	0,0359	0,0320
6,9	0,0271	0,1069	0,0340	0,0763	0,0406	0,0847
13,8	0,0476	0,2231	0,0464	0,2063	0,0200	0,1479
20,7	0,0393	0,0864	0,0393	0,1197	0,0393	0,1337
27,6	0,0504	0,1967	0,0504	0,1204	0,0869	0,1707
34,5	0,0274	0,0963	0,0274	0,1496	0,0869	0,1199



Sin embargo, aumentó también la turbidez en los zumos que no eran sometidos a presiones leves (5,5 Mpa) y a temperatura ambiente. El aumento en la turbidez de los zumos no se produjo cuando éstos eran extraídos del equipo tras la despresurización de la celda (a presión atmosférica) a pesar de haber sido sometidos al tratamiento supercrítico (ver también el apartado 4.3.4).

Por lo tanto, el aumento de la turbidez no se debe al tratamiento supercrítico sino a las fuerzas de cizallamiento que se producen mediante la despresurización. Estas fuerzas provocan una disgregación de las partículas del zumo en partículas más pequeñas y numerosas que se mantienen más tiempo en suspensión, aumentando la turbidez del zumo y disminuyendo la formación de precipitados. En conclusión, el aumento de turbidez del zumo no es dependiente de la presión y la temperatura del tratamiento supercrítico a que se ha sometido sino que depende de las fuerzas producidas al realizar la despresurización simultáneamente a la obtención del zumo una vez tratado.

#### *4.3.3- Efecto del tratamiento con dióxido de carbono supercrítico sobre la modificación del color del zumo de naranja*

Se realizaron los cálculos de precisión del equipo y del método al igual que en la medida de la turbidez (apartado 4.3.2). Los resultados, representados en las figuras 4.3.3a y 4.3.3b respectivamente, fueron igualmente satisfactorios.

La figura 4.3.3c muestra los espectros de absorción UV/VIS de un control, dos zumos sometidos a condiciones supercríticas (obtenidos simultáneamente, SC+FC, o tras la despresurización de la celda, SC) y de un zumo presurizado a 5,5 Mpa, FC.

Los zumos tratados con dióxido de carbono supercrítico y extraídos a presión (SC+FC) ofrecieron valores de absorbancias mayores que los controles en todo el espectro de longitudes de onda estudiado. Estos resultados indican que no existe un cambio en el color

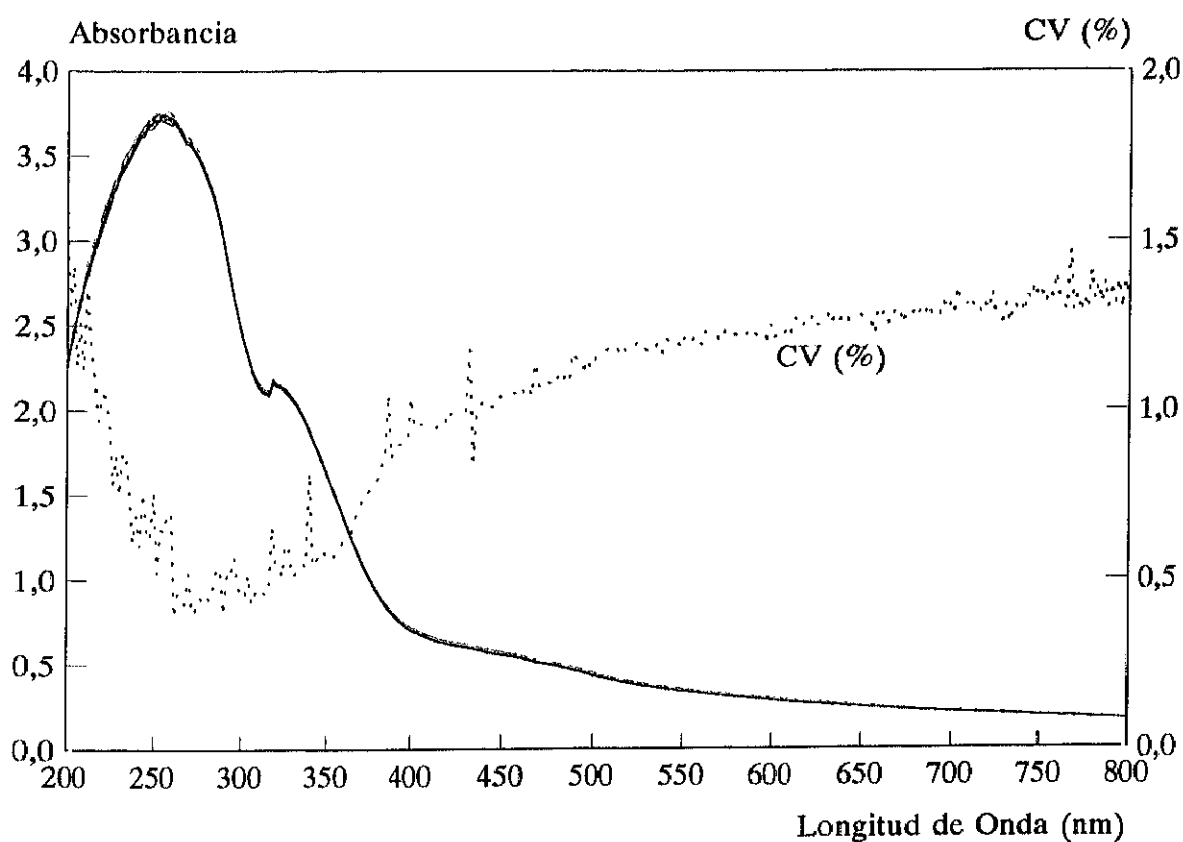


Figura 4.3.3a. Precisión en la medida del espectro UV/VIS

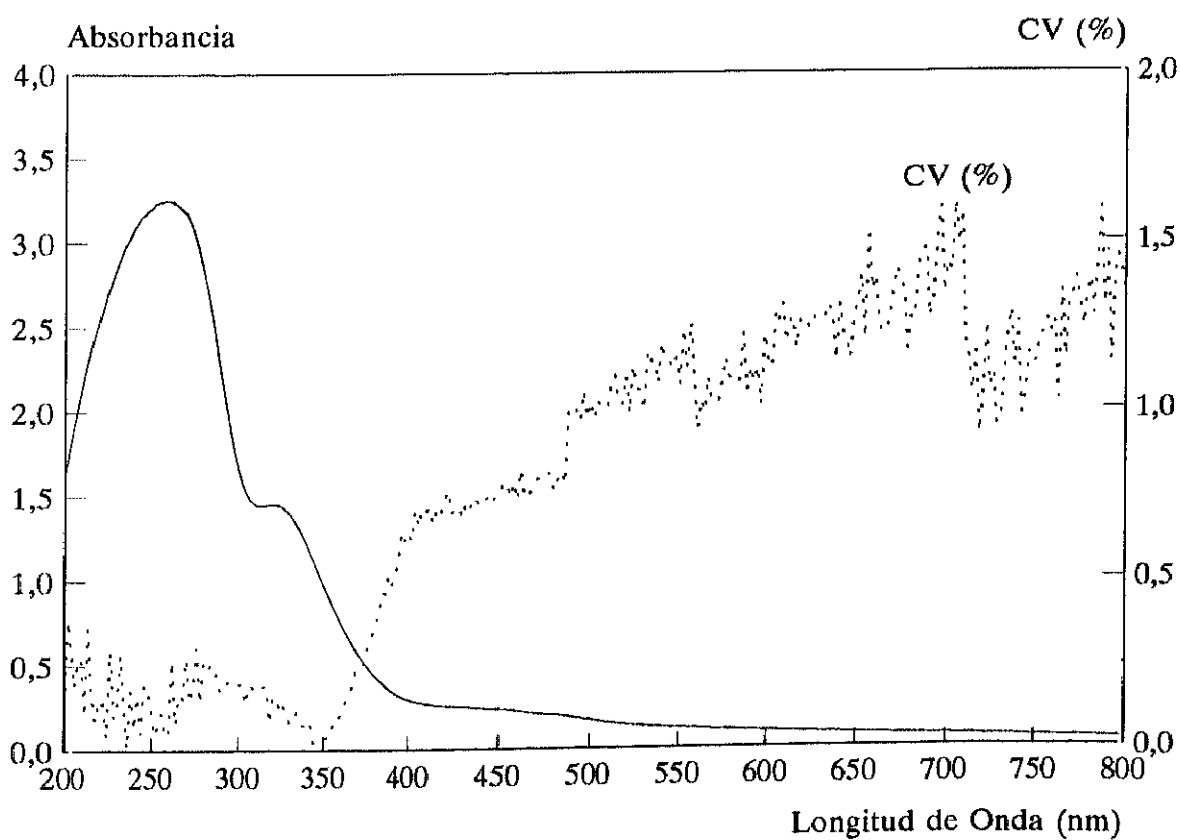


Figura 4.3.3b. Precisión del método de medida del color

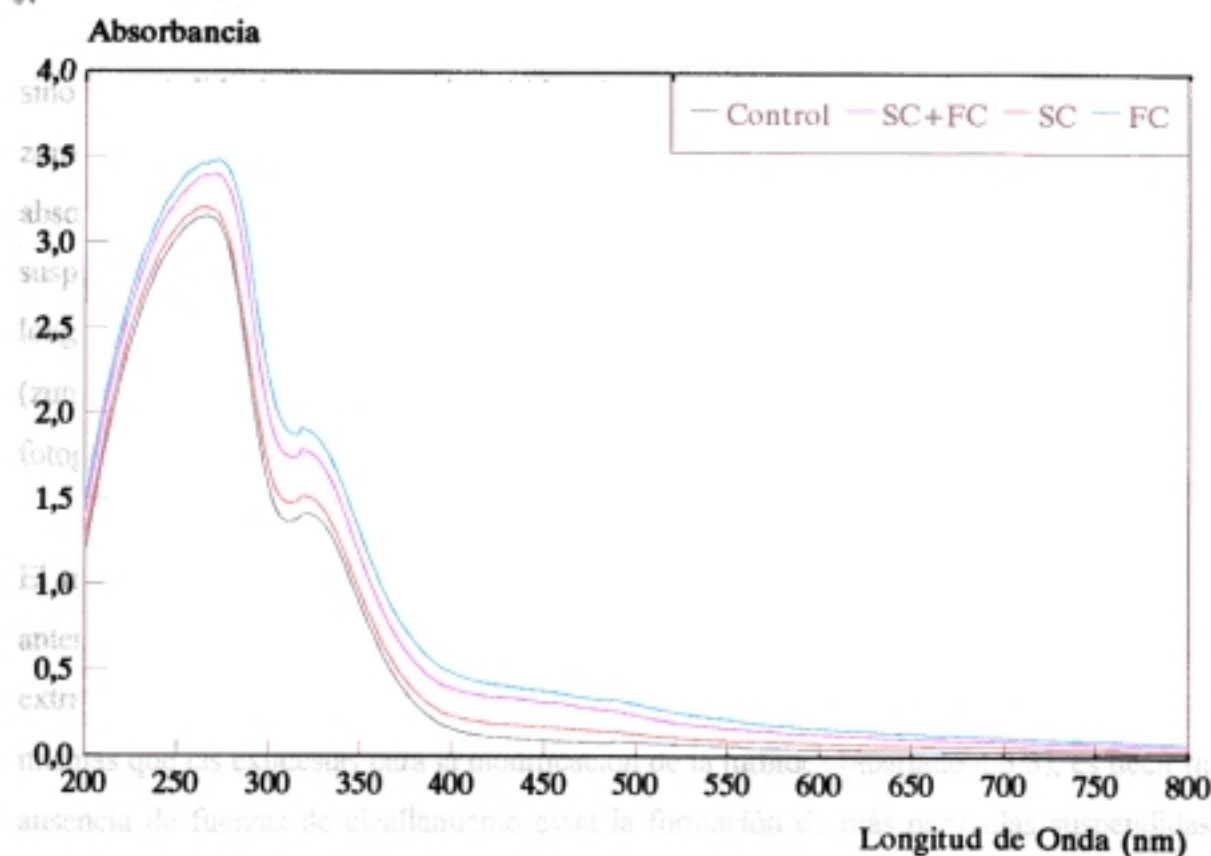


Figura 4.3.3c. Influencia de los tratamientos sobre la variación del espectro UV/VIS

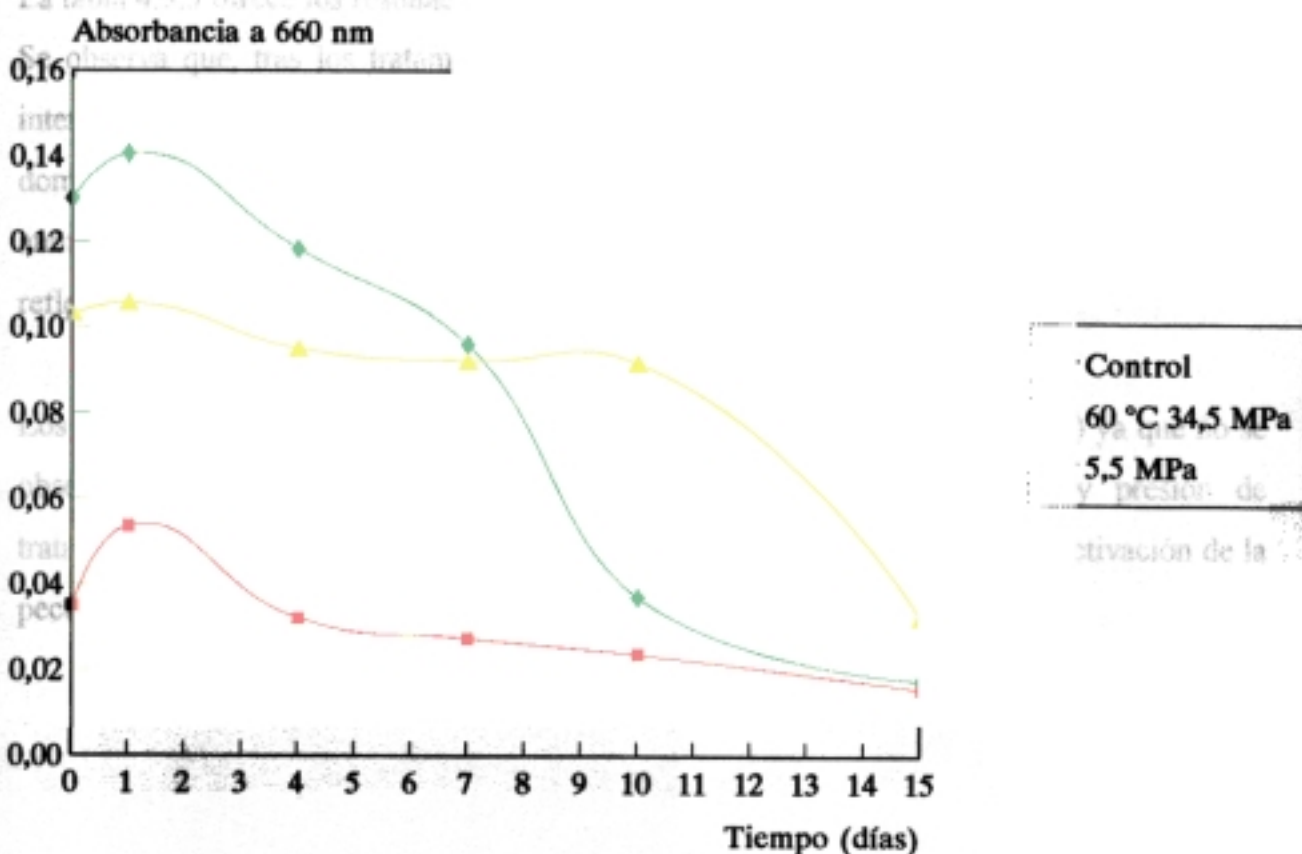


Figura 4.3.4. Variación de la turbidez del zumo de naranja durante el almacenamiento

sino una pérdida de transmitancia debido a la mayor presencia de partículas suspendidas en el zumo. Sin embargo, entre 400 y 600 nm se aprecia que se produce un aumento de la absorbancia que no se corresponde únicamente con un simple aumento de las partículas en suspensión, sino que es debida a la modificación del color. Las mayores absorbancias en estas longitudes de onda producen un viraje de color desde el naranja (control) hasta el amarillo (zumo tratado) fácilmente apreciable bajo un examen visual. La figura 4.3.3d muestra una fotografía de un zumo antes del tratamiento y de otro zumo tratado del modo SC+FC.

El tratamiento a 5,5 MPa y temperatura ambiente (FC) produjo resultados similares a los anteriores. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los zumos tratados y extraídos a presión atmosférica (SC) y los controles. Las causas de estos resultados son las mismas que las expuestas para la modificación de la turbidez (apartado 4.3.3), es decir que la ausencia de fuerzas de cizallamiento evita la formación de más partículas suspendidas, no apreciándose modificación de la transmitancia.

La tabla 4.3.3 ofrece los resultados obtenidos para los controles y los tratamientos realizados. Se observa que, tras los tratamientos, se produce un aumento en los valores de pureza e intensidad, no se produce diferencias significativas en los valores de longitud de onda dominante, y disminuyen los valores de brillantez y tonalidad. Estos resultados se achacan al aumento de la turbidez y no a un cambio de color, excepto los resultados de la tonalidad, que reflejan el cambio del naranja (controles) al amarillo (tratados).

Los resultados obtenidos difieren a los obtenidos por Balaban y Arreola (1991) ya que no se observaron diferencias dependientes de las condiciones de temperatura y presión de tratamiento sino de la forma de obtención del zumo una vez tratado para la inactivación de la pectinesterasa.

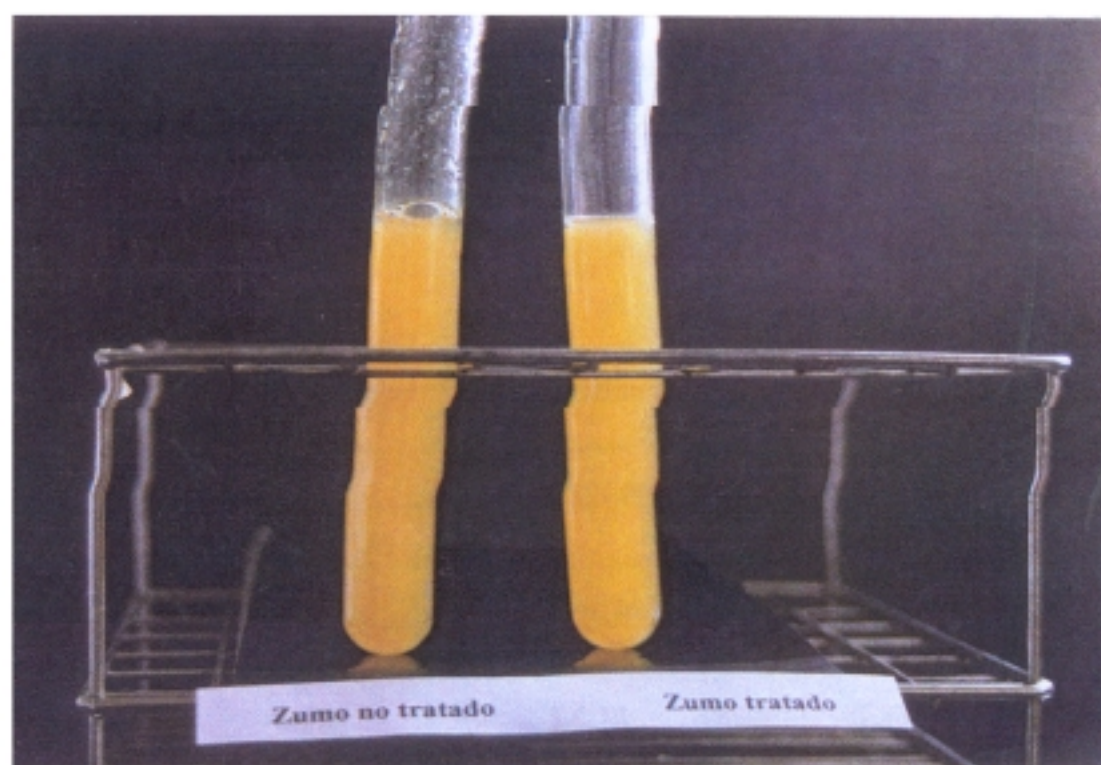


Figura 4.3.3d. Zumo de naranja antes y después del tratamiento con  $\text{CO}_2$  supercrítico.

**Tabla 4.3.3a.** Influencia en la brillantez del tratamiento supercrítico y posterior obtención del zumo a presión.

Presión (MPa)	Temperatura (°C)					
	40		50		60	
	control	SC-CO <sub>2</sub>	control	SC-CO <sub>2</sub>	control	SC-CO <sub>2</sub>
atmosférica	31,82	31,83	31,82	28,41	31,82	37,73
6,9	39,14	2,95	53,41	7,76	25,41	5,67
13,8	47,86	2,34	21,50	0,16	48,58	0,80
20,7	30,89	5,25	30,89	1,90	30,89	1,36
27,6	23,32	0,28	23,32	2,05	35,22	0,60
34,5	37,75	3,97	37,75	0,77	35,22	3,19

**Tabla 4.3.3b.** Influencia en la pureza del tratamiento supercrítico y posterior obtención del zumo a presión.

Presión (MPa)	Temperatura (°C)					
	40		50		60	
	control	SC-CO <sub>2</sub>	control	SC-CO <sub>2</sub>	control	SC-CO <sub>2</sub>
atmosférica	32,28	31,17	32,28	35,98	32,28	32,61
6,9	49,28	91,89	26,30	87,28	47,84	88,91
13,8	30,09	93,19	51,23	98,76	33,37	97,95
20,7	47,48	88,05	47,48	94,27	47,48	95,74
27,6	53,22	95,28	53,22	90,73	43,07	84,01
34,5	38,39	89,29	38,39	96,89	43,07	42,18

**Tabla 4.3.3c.** Influencia en la longitud de onda dominante del tratamiento supercrítico y posterior obtención del zumo a presión.

Presión (MPa)	Temperatura (°C)					
	40		50		60	
	control	SC-CO <sub>2</sub>	control	SC-CO <sub>2</sub>	control	SC-CO <sub>2</sub>
atmosférica	580,2	579,5	580,2	579,8	580,2	578,8
6,9	579,1	585,8	579,5	583,6	581,1	584,6
13,8	579,6	586,8	581,3	592,6	579,2	589,8
20,7	575,4	584,9	575,4	587,4	575,4	585,3
27,6	574,9	587,1	574,9	586,5	577,6	588,3
34,5	580,5	585,6	580,5	589,6	577,6	587,0

**Tabla 4.3.3d.** Influencia en la intensidad del tratamiento supercrítico y posterior obtención del zumo a presión.

Presión (MPa)	Temperatura (°C)					
	40		50		60	
	control	SC-CO <sub>2</sub>	control	SC-CO <sub>2</sub>	control	SC-CO <sub>2</sub>
atmosférica	131,28	131,19	131,28	141,11	131,28	118,33
6,9	128,72	460,35	79,76	347,96	166,96	386,38
13,8	92,92	494,43	189,24	852,96	97,71	676,87
20,7	150,05	388,91	150,05	522,98	150,05	579,09
27,6	181,05	705,14	181,05	485,60	126,48	569,27
34,5	121,78	418,35	121,78	638,57	126,48	348,12

**Tabla 4.3.3e.** Influencia en la tonalidad del tratamiento supercrítico y posterior obtención del zumo a presión.

Presión (MPa)	Temperatura (°C)					
	40		50		60	
	control	SC-CO <sub>2</sub>	control	SC-CO <sub>2</sub>	control	SC-CO <sub>2</sub>
atmosférica	$-2,75 \cdot 10^{-3}$	$-2,77 \cdot 10^{-3}$	$-2,75 \cdot 10^{-3}$	$-3,15 \cdot 10^{-3}$	$-2,75 \cdot 10^{-3}$	$-3,11 \cdot 10^{-3}$
6,9	$-6,08 \cdot 10^{-3}$	$-1,483 \cdot 10^{-2}$	$-1,98 \cdot 10^{-3}$	$-1,314 \cdot 10^{-2}$	$-3,97 \cdot 10^{-3}$	$-1,367 \cdot 10^{-2}$
13,8	$-2,42 \cdot 10^{-3}$	$-1,590 \cdot 10^{-2}$	$-4,42 \cdot 10^{-3}$	$-2,704 \cdot 10^{-2}$	$-2,77 \cdot 10^{-3}$	$-2,522 \cdot 10^{-2}$
20,7	$-7,75 \cdot 10^{-3}$	$-1,172 \cdot 10^{-2}$	$-7,75 \cdot 10^{-3}$	$-1,569 \cdot 10^{-2}$	$-7,75 \cdot 10^{-3}$	$-2,418 \cdot 10^{-2}$
27,6	$-9,15 \cdot 10^{-3}$	$-2,200 \cdot 10^{-2}$	$-9,15 \cdot 10^{-3}$	$-1,315 \cdot 10^{-2}$	$-5,16 \cdot 10^{-3}$	$-3,48 \cdot 10^{-3}$
34,5	$-3,45 \cdot 10^{-3}$	$-1,266 \cdot 10^{-2}$	$-3,45 \cdot 10^{-3}$	$-1,892 \cdot 10^{-2}$	$-5,16 \cdot 10^{-3}$	$2,38 \cdot 10^{-2}$



#### ***4.3.4- Modificación de la turbidez y color del zumo de naranja durante el almacenamiento***

Las figuras 4.3.4a y b muestran fotografías de los zumos conservados a 4 °C tras un día y una semana, respectivamente, del tratamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico. Se observa que tras un día todas las muestras han clarificado parcialmente. La turbidez del clarificado es mayor en los dos zumos tratados que en el zumo control debido al aumento del número de menores partículas en suspensión. Además, se observa que el volumen de precipitado es menor en los zumos tratados, ya que parte de éste aún se conserva en suspensión, y su aspecto es más gelatinoso. Las observaciones realizadas tras una semana de almacenamiento desde el tratamiento sirvieron para marcar más las diferencias entre el zumo control y los tratados.

Respecto a los zumos almacenados a temperatura ambiente se realizaron medidas de turbidez durante 15 días, tras los que los zumos presentaban ya un deterioro que imposibilitó la realización de posteriores medidas. Los resultados se representan en la figura 4.3.4c. En los tres casos estudiados se observó un aumento de turbidez al cabo de un día, debido probablemente a la actuación de otros procesos enzimáticos que producen un aumento del número de partículas estables en suspensión (poligalacturonasas y pectín-liasas), con el consiguiente aumento de la turbidez.

A partir del cuarto día de almacenamiento, el zumo que no fue sometido a ningún tratamiento recuperó el valor inicial de la turbidez y ésta siguió perdiéndose lentamente hasta el día 15. Hay que tener en cuenta que la turbidez inicial en los controles es baja, con lo que la disminución que se produce durante el almacenamiento es poco pronunciada.

Los zumos que sufrieron las fuerzas de cizallamiento (SC+FC y FC, figura 4.3.4c), producidas por la salida del dióxido de carbono a presión, alcanzaron valores iniciales de turbidez sensiblemente mayores a los controles, tal como ya se ha indicado en el apartado 4.3.2, pero no se puede considerar significativa la diferencia de turbidez entre estos dos tipos de tratamientos.

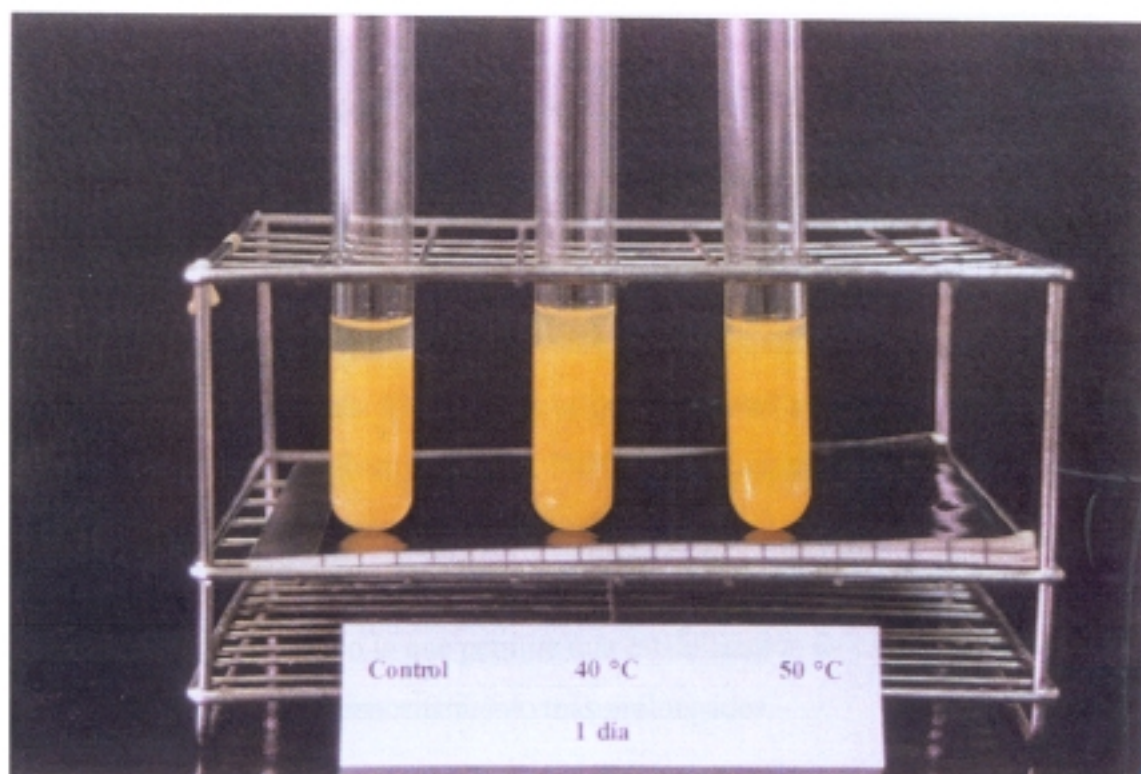


Figura 4.3.4a. Zumo de naranja tras 1 día de almacenamiento a 4 °C.

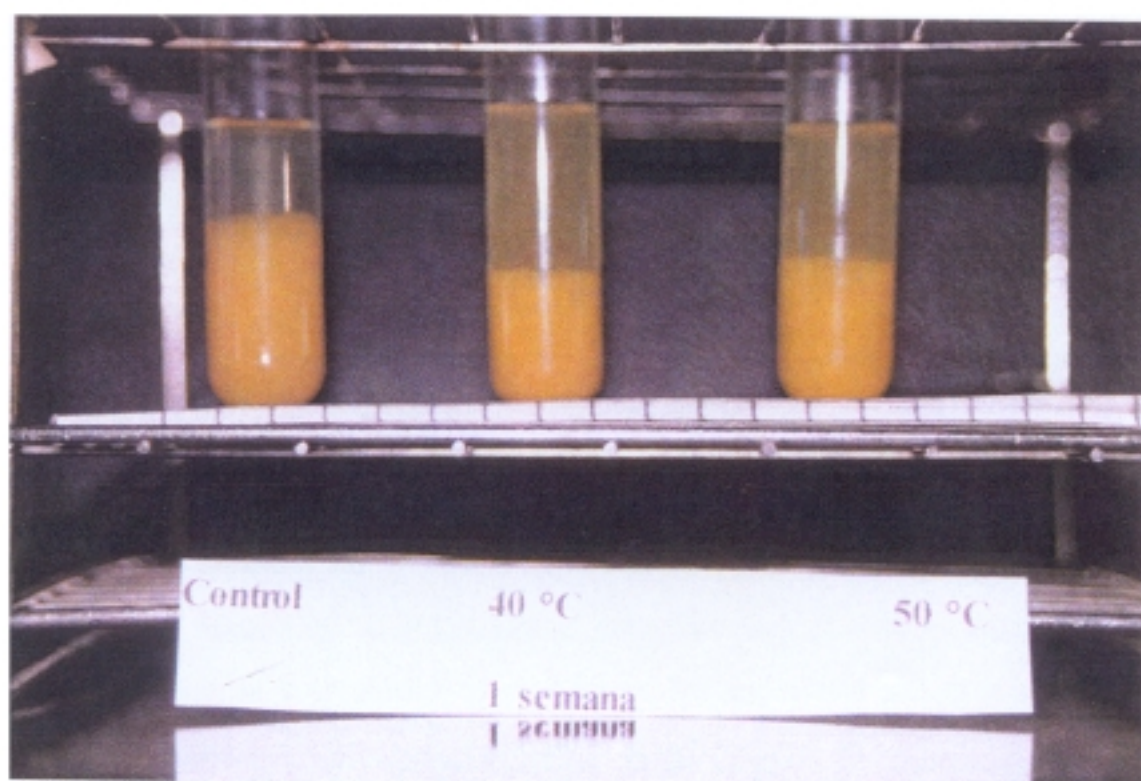


Figura 4.3.4b. Zumo de naranja tras 1 semana de almacenamiento a 4 °C.

El zumo presurizado (FC, figura 4.3.4c) sufrió una rápida pérdida de turbidez desde el día 1 hasta el día 10, ya que el aumento de la turbidez fue compensado posteriormente por la acción de la pectinesterasa, que conservaba plenamente su actividad. Posteriormente, la clarificación se desarrolló más lentamente.

El zumo sometido a condiciones supercríticas (SC + FC, figura 4.3.4c) mantuvo estables los valores de turbidez hasta el día 10 debido a la baja actividad pectinesterásica. Una posible reactivación del enzima (Balaban y Arreola, 1991) fue la causante de la pérdida de turbidez entre los días 10 y 15. De este modo se comprueba que se mejora la turbidez de un zumo con el tratamiento de presión, si bien es la inactivación de la pectinesterasa llevada a cabo con el dióxido de carbono supercrítico la que permite una estabilización de estos valores elevados de turbidez durante tiempos de almacenamiento más prolongados.

## CONCLUSIONES

- 1ª. El análisis de la grasa láctea por cromatografía líquida de alta eficacia junto con el análisis por GC de los ácidos grasos de las fracciones procedentes de la separación por HPLC permitió la estimación de 181 especies moleculares, 30 de ellas identificadas por primera vez, debiéndose destacar la presencia de 10 triglicéridos con un número impar de carbonos y 3 con un ácido graso de cadena ramificada.
- 2ª. La comparación en la composición triglicérica de la grasa de leche de oveja, cabra y vaca, pone de manifiesto que la de oveja es la más enriquecida en triglicéridos saturados de media, la de vaca en triglicéridos de cadena larga saturados y la de cabra en triglicéridos saturados de cadena media.
- 3ª. La adición de un soporte sólido e inerte que aumente la superficie de contacto y evite la formación de canales preferenciales es necesario para mejorar el rendimiento de las extracciones y, sobre todo, la extracción selectiva de colesterol.
- 4ª. Las condiciones de 14,5 MPa y superiores en presencia de bolas de vidrio son las que proporcionan una mayor reducción de colesterol en la nata (75%) independientemente de la temperatura. La mayor selectividad se consigue a la densidad de 0,7 g/mL y temperatura de 60 °C.
- 5ª. La espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -RMN ha demostrado ser una técnica de utilidad por ser complementaria a las técnicas cromatográficas usadas en la presente memoria.
- 6ª. El detector de masa a 30 °C y 121 kPa es adecuado para el análisis cuantitativo por HPLC de esteroides y escualeno en mezclas en las que exista una gran variedad de estos compuestos.

- 7ª. La mayor selectividad en la extracción de escualeno respecto a los esteroides en los destilados analizados se consigue a bajas presiones (10 - 20 MPa) y altas temperaturas (60 y 50 °C), si bien, densidades muy bajas (0,29 - 0,39 g/mL) conducen a bajos rendimientos de la extracción.
- 8ª. La inactivación de la pectinesterasa responde a una cinética de orden cero, siendo la constante de velocidad directamente proporcional a la temperatura y presión del tratamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico.
- 9ª. El aumento de la turbidez y la variación de color de los zumos tratados se debe a la aparición de fuerzas de cizallamiento en el caso de que la obtención del zumo sea simultánea a la despresurización. La variación de la turbidez y el color, en las condiciones estudiadas, es independiente de la presión y la temperatura del tratamiento.
- 10ª. La inactivación de la pectinesterasa junto con la obtención del zumo simultáneamente a la despresurización contribuye a preservar el aspecto del zumo durante el almacenamiento, ya que, a temperatura ambiente, se consigue un aumento de la turbidez y su mantenimiento hasta un tiempo de 15 días.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ackman, R.G. (1970) The analysis of fatty acids and related materials by gas-liquid chromatography. *Progress in the chemistry of the fats and other lipids* 12, 167.
- Ackman, R.G. (1986) *Analysis of Oils and Fats*, Elsevier Applied Science, Amsterdam.
- Aihara, H., Watanabe, K., Nakamura, R. (1988) Degradation of cholesterol in hen's egg yolk and its lipoprotein by extracellular enzymes of *Rodococcus equi*. *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie* 21, 342.
- Anifantakis, E.M. (1986) Comparision of the physico-chemical properties of the ewe's and cow's milk. *Boletín FIL-IDF*. 202, 42.
- Anónimo, (1989) Cholesterol reduction technologies overview, *Wisconsin Milk Marketing Board Research Review, Special report* 2.
- Antila, V., Kankare, V. (1983) The fatty acid composition of milk lipids. *Milchwissenschaft* 38, 478.
- AOAC (1990) "Official methods of analysis" Method 920.107 14<sup>th</sup> ed. Association of official analytical chemists, Arlington, Estados Unidos.
- Arntfield, S.D., Bulley, N.R., Crerar, W.J. (1992) Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of egg yolk: impact of temperature and entrainer on residual protein. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 823.
- Arreola, A.G. (1990) Effect of supercritical carbon dioxide on some quality attributes of single strength orange juice. M. Sc Tesis. Universidad de Florida, Gainesville, Estados Unidos.
- Artho, A., Grob, K., Mariani, C. (1993) On-line LC-GC for the analysis of the minor components in edible oils and fats - The direct method involving silylation. *Fat Sci. Technol.* 95, 176.
- Arul, J., Boudreau, A., Makhlouf, J., Tardif, R., Sashasrabudhe, M.R. (1987) Fractionation of anhydrous milk fat by supercritical carbon dioxide. *J. Food Sci.* 52, 1231.
- Arul, J., Boudreau, A., Makhlouf, J., Tardif, R., Grenier, B. (1988) Distribution of cholesterol in milk fat fractionations. *J. Dairy Res.* 55, 361.
- Aursand, M., Rainuzzo, J.R., Grasdalen, H. (1993) Quantitative high-resolution <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance of  $\omega$ 3 fatty acids from white muscle of atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70, 971.
- Baggio, G., Pagnan, A., Muraca, M., Martini, S., Opportuno, A., Bonanome, A., Ambrosio, G.B., Ferrari, S., Guarini, P., Piccolo, D., Manzato, E., Corrocher, R., Crepaldi, G. (1988) Olive oil enriched diet: effect on serum lipoprotein levels and biliary cholesterol saturation. *American Journal of clinical nutrition* 47, 960.

- Bailey, A.E. (1951) Composition of glycerides with randomly distributed fatty acid radicals. *Industrial oil and fat products*, 2<sup>a</sup> ed., Interscience, New York, 834.
- Balaban, M.O., Arreola, A.G. (1991) Supercritical carbon dioxide applied to citrus processing. *Transactions of the 37th Annual Citrus Engineering Conference, Am. Soc. Mechanical Eng.*, Fl section, Lakeland, Estados Unidos.
- Bannon, C.D., Craske, J.D., Hai, N.T., Harper, N.L., O'Rourke, K.L. (1982a) Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. II. Methylation of fats and oils with boron trifluoride-methanol. *J. Chromatogr.* **247**, 63.
- Bannon, C.D., Breen, G.J., Craske, J.D., Hai, N.T., Harper, N.L., O'Rourke, K.L. (1982b) Analysis of the fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. III. Literature review of and investigations into the development of rapid procedures for the methoxide-catalysed methanolysis of fats and oils. *J. Chromatogr.* **247**, 71.
- Barrón, L.J.R., Santa-María, G. (1987) Non-aqueous reversed-phase HPLC analysis of triglycerides. *Chromatographia* **23**, 209.
- Barrón, L.J.R., Santa-María, G., Díez-Masa, J.C. (1987) Influence of bonded-phase column type, mobile phase composition, temperature and flow-rate in the analysis of triglycerides by RP-HPLC. *J. Liquid Chromatogr.* **10**, 3193.
- Barrón, L.J.R. (1989) Composición triglicéridica de grasas y aceites naturales. Identificación y cuantificación de especies moleculares por cromatografía líquida de alta eficacia. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- Barrón, L.J.R., Hierro, M.T.G., Santa-María, G. (1990) HPLC and GLC analysis of the triglyceride composition of bovine, ovine and caprine milk fat. *J. Dairy Res.* **57**, 517.
- Barth, M.M., Cen-Zhou, Kute, K.M., Rosenthal, G.A. (1995) Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot (*Daucus carota* L.) tissue. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 2876.
- Bayol, A., Maffrand, J.P., González, B., Frankinet, J. (1988) Process for the elimination of steroid compounds contained in a substance of biological origin. Patente australiana n° 28449/89.
- Beitz, D.C., Young, J.W., Dehal, S.S. (1990) Method of converting cholesterol in food to coprostanol. Patente de los Estados Unidos N° 4.921.710.
- Bennet, R.D. (1987) De la presentación al Citrus Products Technical Committee Del USDA Fruit and Vegetable Laboratory, Pasadena, Estados Unidos.
- Beynen, A.C., Katan, M.B., van Zutphen, L.F.M. (1987) Hypo- and hyperresponders: individual differences in the response of serum cholesterol concentration to changes in diet. *Advances in lipid research* **22**, 115.

- Bonanome, A., Grundy, S.M. (1988) Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *New England journal of medicine*, **318**, 1224.
- Bondioli, P., Mariani, C., Lanzani, A., Fedeli, E., Mossa, A., Muller, A. (1992) Lampante olive oil refining with supercritical carbon dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 477.
- Bondioli, P., Mariani, C., Lanzani, A., Fedeli, E., Muller, A. (1993) Squalene recovery from olive oil deodorizer distillates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 763.
- Bornaz, S., Novak, G., Parmentier, M. (1992) Seasonal and regional variation in triglyceride composition of french butterfat. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 1131.
- Boyazoglu, J. (1989) La production laitière ovine en systèmes extensifs méditerranéens. *Le lait dans la région méditerranéenne. Options méditerranéennes*. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes (CIHEAM) série séminaires **6**, 141.
- Bradley, R.L. Jr. (1989) Removal of cholesterol from milk fat using supercritical carbon dioxide. *J. Dairy Sci.* **72**, 2834.
- Breckenbridge, W.C., Marai, L., Kuksis, A. (1969) Triglyceride structure of human milk fat. *Can. J. Biochem.* **47**, 761.
- Breitmaier, E., Haas, G., Voelter, W. (1975) Atlas of  $^{13}\text{C}$ -NMR. Ed. Heyden & Son Ltd., Norfolk, Reino Unido.
- Brignole, E.A., Andersen, P.M., Fredenslund, A. (1987) Supercritical fluid extraction of alcohols from water. *Ind. Eng. Chem.* **26**, 254.
- Bruemmer, J.H. (1980) 8. Relationship of citrus enzymes to juice quality. *Citrus Nutrition and Quality*, Ed. S. Nagy, J.A. Attaway, ACS Symposium Series, Division of Agricultural and Food Chemistry at the 179th Meeting of the American Chemical Society, Houston, Estados Unidos.
- Bulley, N.R., Fattori, M., Meisen, A., Moyls, L. (1984) Supercritical fluid extractions of vegetable oil seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**, 1362.
- Byeung, H.L. (1993) Extraction and separation of EPA from sardine by using supercritical carbon dioxide extraction. *J. Korean Society of Food and Nutrition* **22**, 629.
- Charlesworth, J.M. (1978) Evaporative analyser as a mass detector for liquid chromatography. *Anal. Chem.* **50**, 1414.
- Chen, H., Schwartz, S.J., Spanos, G.A. (1992a) Fractionation of butter oil by supercritical carbon dioxide. *J Dairy Sci.* **75**, 2659.
- Chen, J.S., Balaban, M.O., Cheng-i, W., Marshall, M.R., Hsu, W.Y. (1992b) Inactivation of polyphenol oxidase by high-pressure carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2345.



- Chen, J.S., Balaban, M.O., Wei, C.I., Gleeson, R.A., Marshall, M.R. (1993) Effect of carbon dioxide on the inactivation of Florida spiny lobster polyphenol oxidase. *J.Sci. Food Agric.* **61**, 253.
- Chrastil, J. (1982) Solubility of solids and liquids in supercritical gases. *J. Phys. Chem.* **86**, 3016.
- Christianson, D.D., Friedrich, J.P., List, G.R., Warner, K., Bagley, E.B., Stringfellow, A.C., Inglett, G.E. (1984) Supercritical fluid extraction of dry-milled corn germ with carbon dioxide. *J. Food Sci.* **49**, 229.
- Christie, W.W. (1982) Lipid analysis. Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. Pergamon Press, Oxford, Reino Unido.
- Christie, W.W. (1987) The analysis of lipids with special reference to milk fat. Recent advances in chemistry and technology of fats and oils. Ed. R.J. Hamilton, A. Bhati, Elsevier Applied Science, Londres, Reino Unido, 57.
- Christie, W.W. (1989) *Gas chromatography and lipids*. The Oily Press Ltd, Alloway, Reino Unido.
- Christie, W.W. (1991) Recent developments in high-performance liquid and gas chromatography of lipids. *Rev. Fran. Corps Gras* **38**, 155.
- Christie, W.W. (1992) Detectors for high performance liquid chromatography of lipids with special reference to evaporative light-scattering detection. *Advances in lipid methodology* - one. Ed. W.W. Christie, The Oily Press, Ayr, Reino Unido, 239.
- C.O.I. (1995) Norma comercial aplicable al aceite de oliva y al aceite de orujo de oliva. Comité Oleícola Internacional T.15, N° 2, rev. 3, 24 de noviembre de 1995.
- Coll Hellin, L., Clausell, M. del P. (1985) Incidencia de la fritura en la composición de la fracción lipídica de diversos aperitivos de consumo generalizado en nuestro país. *Anales de Bromatología* **36**, 207.
- Coll Hellin, L. (1988) Estudio del insaponificable de la grasa de sardinas frescas del mercado de Madrid. *Anales de Bromatología* **40**, 351.
- Cortesi, N., Fedeli, E., Gasparoli, A., Tiscornia, E. (1977) Cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) nell'analisi degli insaponificabili degli oli vegetali. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **54**, 16.
- Cos Blanco, A.I. de (1992) VI. Las grasas. Características, tipos y función. Alimentos ricos en grasa. Carencias y excesos. *Manual de la alimentación y nutrición para educadores*, Notigraf S.A., Madrid.
- Craske, J.D., Bannon, C.D. (1987) Gas liquid chromatography of the fatty acid composition of fats and oils: a total system for high accuracy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**, 1413.

- Craske, J.D., Bannon, C.D., Norman, L.M. (1988) Limitations of ambient temperature methods for the methanolysis of triacylglycerols in the analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 262.
- Cully, J., Vollbrecht, H.R., Weismaller, J. (1990) Process for the removal of cholesterol or cholesterol esters for egg yolk. *Patente australiana* n° 60836/90.
- Dakovic, S., Turkulov, J., Dimic, E. (1989) Quality of vegetable oils obtained by extraction with carbon dioxide. *Fat Sci. Technol* **91**, 116.
- Deffense, E. (1984) Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse des triglycerides des graisses végétales et animales et de leurs fractions obtenues par cristallisation fractionnée. *Rev. Fran. Corps Gras* **31**, 123.
- Deffense, E. (1993) Milk fat fractionation today: a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 1193.
- de la Fuente, M.A., Fontecha, J., Juárez, M. (1993) Fatty acid composition of the triglyceride and free fatty acid fractions in different cows-, ewes- and goats-milk cheeses. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **196**, 155.
- De Jong, C., Badings, H.T. (1990) Determination of the free fatty acids in milk and cheese. Procedures for extraction, clean up and capillary gas chromatographic analysis. *J. High Resol. Chromatogr.* **13**, 94.
- Desjeux, J.F. (1993) Valeur nutritionnelle du lait de chèvre. *Lait* **73**, 573.
- Dreux, M., Lafosse, M., Morin-Allory, L. (1996) The evaporative light scattering detector-A universal instrument for non-volatile solutes in LC and SFC. *LC-GC International* **3**, 148.
- El-Hadmy, A.H., Perkins, E.G. (1981) RP-HPLC of natural triglyceride mixtures: critical pair separation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **9**, 867.
- Evans, R., McHale, W.Z. (1978) Multiple forms of pectinesterase in limes and oranges. *Phytochem.* **17**, 1073.
- Favati, F., King, J.W., Friedrich, J.P., Eskins, K. (1988) Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of carotene and lutein from leaf protein concentrates. *J. Food Sci.* **53**, 1532.
- Fedeli, E. (1977) Lipids of olives. *Prog. Chem. Fats other Lipids* **15**, 57.
- Fogarty, W.M., Kelly, C.T. (1983) 3. Pectic Enzymes. *Microbial enzymes and biotechnology*. Ed. W.M. Fogarty, Applied Science Publishers, Essex, Reino Unido.
- Frede, E. (1986) Improved HPLC separation of triglycerides by especial tempering procedures. *Chromatographia* **21**, 29.
- Friedrich, J.P., List, G.R. (1982) Characterization of soybean oil extracted by supercritical carbon dioxide and hexane. *J. Agric. Food Chem.* **30**, 192.

- Friedrich, J.P., Pryde, E.H. (1984) Supercritical carbon dioxide extraction of lipid-bearing materials and characterization of the products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**, 223.
- Froning, G.W., Wehling, R.L., Cuppett, S.L., Pierce, M.M., Niemann, L., Siekman, D.K. (1990) Extraction of cholesterol and other lipids from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide. *J. Food Sci.* **55**, 95.
- Froning, G.W., Fieman, F., Wehling, R.L., Cuppett, S.L., Niemann, L. (1994) Supercritical carbon dioxide extraction of lipids and cholesterol from dehydrated chicken meat. *Poultry Sci.* **73**, 571.
- Goiffon, J.P., Reminiac, C., Olle, M. (1981) Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse des triglycérides des corps gras. I Recherche des meilleures conditions opératoires, cas de l'huile de soja. *Rev. Fran. Corps Gras* **28**, 167.
- Gómez-Cordovés, C., González-SanJosé, M.L. (1995) Interpretation of variables during the aging of red wines: relationship with families of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 587.
- González, L. (1990) Contribución al estudio de la estabilidad físico-química del vino. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Madrid.
- González, L., Pérez-Zúñiga, F.J., Bravo, F. (1990) Color measurement in fermented beverages and derivatives: wines, beers and brandies. *Alimentaria* **10**, 59.
- Grob, K., Artho, A., Mariani, C. (1992) Determination of raffination of edible oils and fats by olefinic degradation products of sterols and squalene, using coupled LC-GC. *Fat Sci. Technol.* **94**, 394.
- Grundy, S.M. (1986) Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. *New England journal of medicine*, **314**, 745.
- Grundy, S.M., Florentin, L., Nix, D., Whelan, M.F. (1988) Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for reducing raised levels of plasma cholesterol in man. *American journal of clinical nutrition*, **47**, 965.
- Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Padley, F.B. (1986) The lipid handbook. Chapman and Hall Ltd. The University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Gunstone, F.D., Herslöf, B.G. (1992) A lipid glossary. The Oily Press, Alloway, Reino Unido.
- Gunstone, F.D. (1993a) I. High resolution  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of lipids. *Advances in lipid methodology - two*. Ed. W.W. Christie, The Oily Press Ltd., Dundee, Reino Unido.
- Gunstone, F.D. (1993b) Information on the composition of fats from their high-resolution  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectra. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 361.

- Gunstone, F.D. (1993c) The composition of hydrogenated fats by high-resolution  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 965.
- Gunstone, F.D., (1994) High resolution  $^{13}\text{C}$  NMR. A technique for the study of lipid structure and composition. *Prog. Lipid Res.* **33**, 19.
- Gurr, M.I. (1989) III. Dairy Fats: Nutritional nasties or dietary delights? *Fats for the future*. De. Ellis Horwood Limited, Chichester, Reino Unido.
- Hachelaf, W., Boukhrela, M., Benbouabdellah, M., Coquin, P., Desjeux, J.F., Boudraa, G., Touhami, M. (1993) Digestibilité des graisse du lait de chèvre chez des enfants présentant une malnutrition d'origine digestive. Comparision avec le lait de vache. *Lait* **73**, 593.
- Haenlein, G.F.W. (1995) Nutritional value of dairy products of ewe's and goat's milk. *Production and utilization of ewes and goats milk. FIL-IDF*, Creta, Grecia.
- Hamilton, R.J. (1986) Thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. Analysis of oils and fats. Ed. R.J. Hamilton, J.B. Rossell, Elsevier Applied Science Publishers, Londres, Reino Unido, 243.
- Hammam, H., Söderberg, Y., Sivik, B. (1991) Physical properties of butter oil fractions obtained by supercritical carbon dioxide extraction. *Fat Sci. Technol.* **93**, 374.
- Hardardottir, I., Kinsella, J.E. (1988) Extraction of lipid and cholesterol from fish muscle with supercritical fluids. *J. Food Sci.* **53**, 1656.
- Henderson, J.M., Petersheim, M., Templeman, G.J., Softly, B.J. (1994) Quantitation and structure elucidation of the positional isomers in a triacylglycerol mixture using proton and carbon one- and two-dimensional NMR. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 435.
- Herslöf, B., Podlaha, O., Toregard, B. (1979) HPLC of triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **56**, 864.
- Herslöf, B., Kindmark, G. (1985) HPLC of triglycerides with gradient elution and mass detection. *Lipids* **20**, 783.
- Hierro, M.T.G., Nájera, A.I., Santa-María, G. (1992) Analysis of triglycerides by reversed-phase HPLC with gradient elution using a light-scattering detector. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* **32**, 635.
- Hierro, M.T.G. (1994) Modificación de la grasa láctea con dióxido de carbono en condiciones supercríticas, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Holen B. (1985) Rapid separation of free sterols by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Am. Oil Che. Soc.* **62**, 1344.

- Hopia, A.I., Piironen, V.I., Koivistoinen, P.E., Hyvönen, L.E.T. (1992) Analysis of lipid classes by solid-phase and high performance size-exclusion chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 772.
- Hopper, M.L., King, J.W., Johnson, J.H., Serino, A.A., Butler, R.J. (1995) Multivessel supercritical fluid extraction of food items in total diet study. *J. AOAC International* **78**, 1072.
- Hoyer, G.G. (1985) Extraction with supercritical fluids: why, how and so what. *Chem. Tech.* **15**, 440.
- Hubert, P., Vitzthum, O.G. (1978) Method for separating caffeine from supercritical solutions. *Angew. Chem. Int Ed. England*, **17**, 710.
- Hung, T.V., Unger, M.A. (1995) Cholesterol reduced egg yolk by supercritical fluid extraction. *Food Australia* **47**, 227.
- Hurst, W.J., Aleo, M.D., Martin, R.A. Jr. (1983) High performance liquid chromatography analysis of cholesterol in milk. *J. Dairy Sci.* **66**, 2192.
- Iverson, J.L., Sheppard, A.J. (1986) Determination of fatty acids in butter fat using temperature-programmed gas chromatography of the butyl esters. *Food Chem.* **21**, 223.
- Jamaluddin, F., Mohamed, S., Lajis, M.N. (1994) Hypoglycaemic effect of *Parkia speciosa* seeds due to the synergistic action of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol. *Food Chem.* **49**, 339.
- Jansen, E.F., Jang, R., Bonner, J. (1960) Orange pectinesterase binding and activity. *Food Res.* **25**, 64.
- Juansolo Barrenechea, M.A. (1992) Estudio de los alimentos del grupo primero: lácteos. Características, preparación, conservación. *Manual de la alimentación y nutrición para educadores*, Notigraf S.A., Madrid.
- Juárez, M., Ramos, M. (1984) Dairy products from ewe's and goat's milk. *Dairy industries international* **49**, 20.
- Juárez, M., Ramos, M. (1986) Physico-chemical characteristics of goat's milk as distinct from those of cow's milk. *FIL-IDF Bull.* **202**, 54.
- Jungro, Y. (1993) Extraction of EPA and DHA from tuna oil using supercritical carbon dioxide. *Korean J. Food Sci. Technol.* **25**, 288.
- Kalra, H., Chung, S.Y.K., Chen, C.J. (1987) Phase equilibrium data for SC extracción of lemon flavors and palm oils with CO<sub>2</sub>. *Fluid phase equil.* **36**, 263.
- Kamihira, M., Taniguchi, M., Kobayashi, T. (1987) Sterilization of microorganisms with supercritical carbon dioxide. *Agric. Biol. Chem.*, **2**, 407.

- Kankare, V., Antila, V., Harvala, T., Komppa, V. (1989) Estraction of milk fat with supercritical carbon dioxide. *Milchwissenschaft* **44**, 407.
- Kaufmann, V.W., Biernoth, G., Frede, E., Merk, W., Precht, D., Timmen, H. (1982) Fractionation of butterfat by extraction with supercritical carbon dioxide. *Milchwissenschaft* **37**, 92.
- Kemppinen, A., Kalo, P. (1993) Fractionation of the triacylglycerols of lipase-modified butter oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 1203.
- Kew, T.J., Velduis, M.K. (1961) Cloud stabilization in citrus juice. Patente U.S. **2**, 995,448.
- Kimball, D.A. (1987) Debittering of citrus juices using SCCO<sub>2</sub>. *J. Food Sci.* **52**, 481.
- Kimball, D. (1991) 8. Juice Cloud. *Citrus Processing. Quality Control and Technology*, Ed. Van nostrand Reinhold, AVI, Nueva York, Estados Unidos.
- Kiritsakis, A.K. (1992) El aceite de oliva. A. Madrid Vicente Ediciones. Madrid.
- Knowles, D.E., Richter, B.E., Frede, E., Merk, W., Precht, D., Timmen, H. (1988) Supercritical fluid chromatography: a new technique for AOAC. *Milchwissenschaft* **71**, 451.
- Laakso, P., Kallio, H. (1993) Triacylglycerols in winter butterfat containing configurational isomers of monoenoic fatty acids residues. I. Disaturated monoenoic triacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 1161.
- Lee, H., Chung, B.H., Park, Y.H. (1991) Concentration of tocopherols from soybean sludge by supercritical carbon dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 571.
- Le Jaouen, J.C., Toussaint, G. (1993) Le lait de chèvre en Europe. *Lait* **73**, 407.
- Levy, G.C., Lichter, R.L., Nelson, G.L. (1980) *Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy*, Wiley, Nueva York, Estados Unidos.
- List, G.R., Friedrich, J.P., Pominski (1984) Characterization and processing of cottonseed oil obtained by extraction with supercritical carbon dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**, 1847.
- Luque de Castro, M.D., Valcárcel, M., Tena, M.T. (1994) Analytical supercritical fluid extraction. Springer Lab Manual, Springer-Verlag, Alemania.
- Macrae, R., Dick, J. (1981) Analysis of carbohydrates using the mass detector. *J. Chromatogr.* **210**, 138.
- Macrae, R., Trugo, L.C., Dick, J. (1982) The mass detector: a new detection system for carbohydrate and lipid analyses. *Chromatographia* **15**, 476.
- Madrid, A. (1986) Manual de industrias alimentarias. Antonio Madrid Vicente Ediciones, Madrid.

- Maheshwari, P., Ooi, E.T., Nikolov, Z.L. (1995) Off-flavor removal from soy-protein isolate by using liquid and supercritical carbon dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **72**, 1107.
- Majewski, W., Mengal, P., Perrut, M., Ecalard, J.P. (1994) X. Supercritical fluid fractionation of butter oil. *Supercritical fluid processing of food and biomaterials*. Ed. S.S.H. Rizvi. Blackie Academic and Professional. Estados Unidos.
- Maniongui, C., Gresti, J., Bugat, M., Gauthier, S., Bezard, J., (1991) Determination of bovine butterfat triacylglycerols by reversed-phase liquid chromatography and gas chromatography. *J. Chromatogr.* **543**, 81.
- Mann, E.J. (1994) Ewes' and goats' milk. *Dairy Industries International* junio, 21.
- Marai, L., Breckenbridge, W.C., Kuksis, A. (1969) Specific distribution of fatty acids in the milk fat triglyceride of goat and sheep. *Lipids* **4**, 562.
- Marshall, M.R., Marcy, J.E., Braddock, R.J. (1985) Effect of total solids level on heat inactivation of pectinesterase in orange juice. *J. Food Sci.* **50**, 220.
- Martínez-Castro, I., Alonso, L., Juárez, M. (1986) Gas chromatographic analysis of free fatty acids and glycerides of milk fat using tetramethylammonium hydroxide as catalyze. *Chromatographia* **21**, 37.
- Martínez-Moreno, J.M., Serra-Masía, A. (1980) Composición de las oleínas procedentes de la refinación física del aceite de oliva. *Grasas y aceites* **31**, 183.
- Mattson, F.H., Grundy, S.M. (1985) Comparision of the effects of dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids in man. *J. of lipid research* **26**, 194.
- McHugh, M., Krukonis, V. (1986) *Supercritical fluid extraction*. Principles and practices. Butterworth, Stoneham, Massachusetts, Estados Unidos.
- Macmillan, J.D., Sheiman, M.I. (1974) 4. Pectic Enzymes. *Food related enzymes*. Ed. J.R. Whitaker. Advances in chemistry series, a symposium of the Division of Agricultural and Food Chemistry, 166th Meeting of the American Chemical Society, Chicago, Estados Unidos.
- Mensink, R.P., Katan, M.B. (1987) Effects of monounsaturated fatty acids versus complex carbohydrates on HDL in healthy men and women. *Lancet* **i**, 122.
- Mertens, B., Knorr, D. (1992) Developments of nonthermal processes for food preservation. *Food Technology* **46**, 124.
- Mishra, U.K., Temelli, F., Ooraikul, B. (1993) Extraction and purification of omega-3 fatty acids with an emphasis on supercritical fluid extraction. A review. *Food Res. Int.* **26**, 217.
- Molin, G. (1983) The resistance to carbon dioxide of some food related bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 214.

- Mott, G.E. (1986) Deferred effects of breastfeeding versus formula feeding on serum lipoprotein concentrations and cholesterol metabolism in baboons. The breastfed infant: a model for performance. 91 conferencia Ross en investigación pediátrica, De. L.J. Filer y S.J. Fomon, Columbus, Ohio, Estados Unidos, 144.
- Mourey, H.M., Oppenheimer, L.E. (1984) Principles of operation of an evaporative light-scattering detector for liquid chromatography. *Anal. Chem.* **56**, 2427.
- Myher, J.J., Kuksis, A., Marai, L. (1993) Identification of the less common isologous short-chain triacylglycerols in the most volatile 2.5% molecular distillate of butter oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 1183.
- Neff, W.E., Adlof, R.O., Konishi, H., Weisleder, D. (1993) High-resolution liquid chromatography of the triacylglycerols of *Vernonia galamensis* and *Crepis alpina* seed oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 449.
- Nilsson, W.B., Hudson, J.K. (1993) Solubility of simple and mixed triacylglycerols in supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 749.
- Oakenfull, D., Sidhu, G.S. (1992) Low cholesterol egg and dairy products. *Outlook and Agriculture* **21**, 203.
- Oppenheimer, L.E., Mourey, T.H. (1985) Examination of the concentration response of evaporative light-scattering mass detectors. *J. Chromatogr.* **323**, 297.
- Parodi, P.W. (1982) Positional distribution of fatty acids in triglycerides from milk of several species of mammals. *Lipids* **17**, 437.
- Patton, S., Jensen, R.G. (1975) Lipid metabolism and membrane functions of the mammary gland. *Prog. Chem. Fats and other Lipids* **14**, 163.
- Paul, A.A., Southgate, D.A.T. (1978) McCance and Widdowson's the composition of foods. Londres: HMSO, Reino Unido.
- Perrin, J.L., Prévot, A. (1984) Utilisation d'un détecteur à diffusion de la lumière dans l'analyse des corps gras par CLHP. *Rev. Fse. Corps Gras* **31**, 495.
- Perrin, J.L., Prévot, A. (1986) Use of a laser light scattering detector in HPLC analysis of fats and oils. II. Analysis of triglycerides. *Rev. Fran. Corps Gras* **33**, 437.
- Pitzer, K.S. (1955) Volumetric and thermodynamic properties of fluids (I). Theoretical basis and virial coefficients. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 3427.
- Pitzer, K.S., Lippman, D.Z., Curl, R.F. Jr., Huggins, C.M., Petersen, D.E. (1955) Volumetric and thermodynamic properties of fluids (II). Compressibility factor, vapor pressure, and entropy of vaporization. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 3433.



- Podhala, O., Töregard, B. (1982) A system for identification of triglycerides in reversed phase HPLC chromatograms based on equivalent carbon numbers. *J. High Resol. Chromatogr./Chromatogr. Comm.* **5**, 553.
- Polak, J.T., Balaban, M., Peplow, A., Philips, A.J. (1989) Supercritical carbon dioxide extraction of lipids from algae. *ACS Symp. Ser.* **406**, 449.
- Pollesello, P., Eriksson, O., Kvam, B.J., Paoletti, S., Saris, N-E.L. (1991) <sup>1</sup>H-NMR studies of lipid extracts of rat liver mitochondria. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* **179**, 904.
- Pretsch, E., Clerc, T., Stibl, J., Simon, W. (1976) Tabellen zur Strukturanklärung Organischer Verbindungen mit Spektroskopischer Methoden, Springer, Berlin, Alemania
- Ramos, M., Juárez, M. (1981) The composition of ewe's and goat's milk. *Boletín FIL-IDF* **140**.
- Ramos, M., Juárez, M. (1982) The composition and utilization of ewe's and goat's milk. *FIL-IDF* **2**, 318. Moscú.
- Ramos, M., Juárez, M. (1986a) Métodos analíticos para la identificación de mezclas de leche de diferentes especies. *Revista Española de Lechería* **7**, 19.
- Ramos, M., Juárez, M. (1986b) Chromatographic, electrophoretic and immunological methods for detecting mixtures of milks from different species. *Boletín FIL-IDF* **202**, 175.
- Ramos, M., Juárez, M. (1993) Current research on goat's milk in Spain. *Lait* **73**, 417.
- Razafindrakoto, O., Ravelomanana, N., Rasolofo, A., Rakotoarimanana, R.D., Gourgue, P., Coquin, P., Briend, A., Desjeux, J.F. (1993) Le lait de chèvre peut-il remplacer le lait de vache chez l'enfant malnutri? *Lait* **73**, 601.
- Remeuf, F. (1993) Influence du polymorphisme génétique de la caséine  $\alpha_{s1}$  caprine sur les caractéristiques physico-chimiques et technologiques du lait. *Lait* **73**, 549.
- Riel, R. (1991) I. Composición y estructura físico-química de la leche. *Ciencia y tecnología de la leche*. Amiot, J., Ed. Acribia, S.A., Zaragoza.
- Robinson, J.L., Macrae, R. (1984) Comparison of detection systems for the high-performance liquid chromatographic analysis of complex triglyceride mixtures. *J. High Resol. Chromatogr./Chromatogr. Comm.* **5**, 553.
- Roderbourg, H., Dalemans, D., Bouhon, R. (1990) Process for reducing the content of cholesterol and free fatty acids in an animal fat material and fat material so obtained. Patente australiana n° 51259/90.
- Rombouts, F.M., Pilnik, W. (1980) 5. Pectic Enzymes. *Microbial enzymes and bioconversions*. Ed. A.H. Rose, Academic Press, Londres, Reino Unido.

- Rombouts, F.M., Versteeg, C., Karman, H., Pilnik, W. (1982) Pectinesterases in component part of citrus fruits related to problems of cloud loss and gelation in citrus products. *Use of enzymes in food technology*, Dupuy, Ed. Technique, Paris, 483.
- Rouse, A.H. (1951) Effect of insoluble solids and particle size of pulp on pectinesterase activity in orange juice. *Fl. State Hort. Soc. Proc.* **64**, 162.
- Rouse, A.H., Atkins, C.D., Huggart, R.L. (1954) Effect of pulp quantity on chemical and physical properties of citrus juices and concentrates. *Food Technol.* **8**, 431.
- Rouse, A.H., Atkins, C.D. (1955) Pectinesterase and pectin in commercial citrus juices as determined by methods used at the Citrus Experiment Station. University of Florida Agric. Exp. Stn. **570**.
- Sacchi, P., Addeo, F., Giudicianni, I., Paolillo, L. (1990) Applicazione della spettroscopia  $^{13}\text{C}$ -NMR alla determinazione di mono-digliceridi de acidi grassi liberi nell'olio di oliva di presione e nei rettificati. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, **67**, 245.
- Sacchi, R., Paolillo, L., Giudicianni, I., Addeo, F. (1991) Rapid  $^1\text{H}$ -NMR determination of 1,2 and 1,3 diglycerides in virgin olive oils. *Ital. J. Food Sci.* **4**, 253.
- Sacchi, R., Addeo, F., Giudicianni, I., Paolillo, L. (1992) Analysis of the positional distribution of fatty acids in olive oil triacylglycerols by high resolution  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance of the carbonyl region. *Ital. J. Food Sci.* **4**, 117.
- Sacchi, R., Medina, I., Aubourg, S.P., Giudicianni, I., Paolillo, L., Addeo, F. (1993) Quantitative high-resolution  $^{13}\text{C}$  NMR analysis of lipids extracted from the withe muscle of atlantic tuna (*Thunnus alahunga*). *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1247.
- Saijipaul, S., Makkar, G.S., Ichhponani, J.S. (1994) Technologies for low-cholesterol eggs and dairy products. *Indian Food Industry* **13**, 46.
- Schneider, G.M., (1978) Physical-chemical principles of extraction with above-critical gases. *Angew. Chem.* **90**, 762.
- Señoráns, F.J., Tabera, J., Herraiz, M. (1996) Rapid separation of free sterols in edible oils by on-line coupled reversed phase liquid-chromatography-gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* (en prensa).
- Seymour, T.A., Preston, J.F., Wicker, L., Lindsay, J.A., Marshall, M. (1991a) Purification and properties of pectinesterase of Marsh Grapefruit pulp. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1075.
- Seymour, T.A., Preston, J.F., Wicker, L., Lindsay, J.A., Wei, C., Marshall, M.R. (1991b) Stability of pectinesterase of Marsh white grapefruit pulp. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1080.
- Shantha, N.C., Napolitano, G.E. (1992) Gas chromatography of fatty acids. *J. Chromatogr.* **624**, 37.
- Sheppard, A.J., Iverson, J.L. (1975) Esterification of fatty acids for gas-liquid chromatographic analysis. *J Chromatogr. Sci.* **13**, 448.

- Shishikura, A., Fujimoto, K., Kaneda, T., Arai, K., Saito, S. (1986) Modification of butter oil by extraction with supercritical carbon dioxide. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 1209.
- Shukla, A., Bhaskar, A.R., Rizvi, S.S.H., Mulvaney, S.J. (1994) Physicochemical and rheological properties of butter made from supercritical fractionated milk fat. *J. Dairy Sci.* **77**, 54.
- Sickinger, K. (1975) Clinical aspects and therapy of fat malassimilation with particular reference to the use of medium chain triglycerides. The role of fats in human nutrition. De. A.J. Vergroesen, Academic Press, Londres, Reino Unido, 116.
- Sidisky, L.M., Ridley, H.J. (1991) Temperature dependence of equivalent chain length values on capillary columns of different polarity. *J. High Resolut. Chromatogr.* **14**, 191.
- Sigmund, P.M., Trebble, M.A. (1992) Phase behaviour prediction in supercritical systems using generalized solute critical properties. *Can. J. Chem. Eng.* **70**, 814.
- Sim, J.S., Bragg, D.B. (1977) Effect of the dietary factors on serum and egg yolk cholesterol levels of laying hens. *Poultry Sci.* **56**, 1616.
- Snir, R., Koehler, P.E., Sims, K.A., Wicker, L. (1996) Total and thermostable pectinesterase in citrus juices. *J. Food Sci.* **61**, 379.
- Snyder, J.M., Friedrich, J.P., Christianson, D.D. (1984) Effect of moisture and particle size of the extractability of oils from seeds with supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**, 1851.
- Sparling, M.L., Zidovetzki, R., Muller, L., Chan, S.I. (1989) Analysis of membrane lipids by 500 MHz <sup>1</sup>H NMR. *Analytical Biochemistry*, **178**, 67.
- Staby, A., Borch-Jensen, C., Balchen, S., Mollerup, J. (1994) Quantitative analysis of marine oils by capillary supercritical fluid chromatography. *Chromatographia* **39**, 697.
- Stahl, E., Schuetz, E., Mangold, H.K. (1980) Extraction of seed oils with liquid and supercritical carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.* **28**, 1153.
- Stahl, E., Quirin, K.W., Gerard, D., (1987) *Verdich. Gase Zur Extractk. Raffina*, Springer, Berlin, Alemania.
- Stolyhwo, A., Colin, H., Ghiochon, G. (1983) Use of light scattering as a detector principle in liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **265**, 1.
- Stolyhwo, A., Colin, H., Martin, M., Guiodon, G. (1984) Study of the quantitative properties of the light-scattering detector. *J. Chromatogr.* **288**, 253.
- Stolyhwo, A., Colin, H., Guiochon, G. (1985) Analysis of triglycerides in oils and fats by liquid chromatography with laser light scattering detector. *Anal. Chem.* **57**, 1342.

- Stolyhwo, A., Martin, M., Guiochon, G. (1987) Analysis of lipids classes by HPLC with the evaporative light scattering detector. *J. Liquid Chromatogr.*, 1237.
- Sutter, L.E.D.N., Silva, M.F.F., Cassel, E. (1994) Supercritical extraction, a new industrial technology. *Ciencia e tecnologia de alimentos* 14, 3.
- Sze, D.Y., Jardetzky, O. (1990) Characterization of lipid composition in stimulated human lymphocytes by  $^1\text{H}$ -NMR. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1054, 198.
- Takahashi, K., Hirano, T., Saito, M. (1988) Application of partition chromatographic theory for the analysis of marine triglyceride molecular species. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54, 523.
- Taniguchi, M., Tsuji, T., Shibata, M., Kobayachi, T. (1985) Extraction of oils from wheat germ with supercritical carbon dioxide. *Agric. Biol. Chem.* 49, 2367.
- Taniguchi, M., Kamihira, M., Kobayashi, T. (1987) Effect of treatment with supercritical carbon dioxide on enzymatic activity. *Agric. Biol. Chem.* 2, 593.
- Temelli, F. (1987)  $\text{SCCO}_2$  extraction of terpernes from cold pressed valencia orange oil. Conferencia Ph.D. Universidad de Florida, Gainesville, Estados Unidos.
- Temelli, F., Chen, C.S., Braddock, R.J. (1988)  $\text{SCCO}_2$  extraction in citrus oil processing. *Food Technol.* 8, 145.
- Temelli, F., LeBlanc, E., Long, F. (1995) Supercritical  $\text{CO}_2$  extraction of oil from Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) and protein funciaonality. *J. Food Sci.* 60, 703.
- Timms, R.E., (1989) XVII. The possibilities for using modified milk fats in the production of confectionary fats, shortenings and spreads. *Fats for the future*. Ed. Ellis Horwood Limited, Chichester, Reino Unido.
- Ting, S.V., Rouseff, R.L. (1986) Citrus Fuits and Their Products. Analysis, Techonology, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Estados Unidos.
- Tirtiaux, F. (1976) Industrial fractionation of fats by controlled crystallization. *Oléagineux* 31, 279.
- Utrilla, R.M., Juárez, M., Martínez-Castro, I. (1976) El factor tiempo en la conversión de grasa en ésteres metílicos. *Grasas y aceites.* 27, 323.
- Varsel, C. (1980) Citrus juice processing as related to quality and nutrition. Citrus Nutrition and Quality. S. Nagy y J.A. Attaway, eds. ACS Symposion series, 145, Washington, D.C., Estados Unidos.
- Vázquez Martínez, C. (1992) I. Problemas de las sociedades desarrolladas en relación con la nutrición. *Manual de la alimentación y nutrición para educadores*, Notigraf S.A., Madrid.

- Vega, P.J., Sims, C., O'Keefe, S., Balaban, M.O. (1995) Supercritical carbon dioxide extraction efficiency of carotenes from carrots. *IFT Annual Meeting 1995*. Póster.
- Veisseyre, R. (1980) I. Caracteres, composición y estructura de la leche, *Lactología técnica*, Ed. Acribia, Zaragoza.
- Versteeg, C. (1979) Pectinesterase from the orange fruit - their purification, general characteristics and juice colud destabilizing properties. *Agric. Res. Rep* **892**, Purdoc, Wageningen, Netherlands.
- Versteeg, C., Rombouts, F.M., Pilnik, W. (1978) Purification and some characteristics of two pectinesterase isoenzymes from orange. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **11**, 267.
- Versteeg, C., Rombouts, F.M., Spaasen, C.H., Pilnik, W. (1980) Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterase from orange. *J. Food Sci.* **45**, 969.
- Wada, S., Koizumi, C., Nonaka, J. (1977) Analysis of triglycerides of soybean oil by high performance liquid chromatography in combination with gas liquid chromatography. *Yukagaku* **26**, 95.
- Wada, S., Koizumi, C., Takiguchi, A., Nonaka, J. (1978) A study on triglyceride composition of lipid from commercial beef by high performance liquid chromatography. *Yukagaku* **27**, 579.
- Walker, B.L. (1992) Optimization of extraction and purification of pectinesterase from Florida oranges, *MS Tesis, Dept. of Food Science and Human Nutrition*, Universidad de Florida, Gainesville, Estados Unidos.
- Walstra, P., Jenness, R. (1984) *Dairy Chemistry and Physics*. John Willey and Sons, Nueva York, Estados Unidos.
- Warner, K., Mounts, T.L. (1990) Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable oils by HPLC with eveporative light-scattering detection. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**, 827.
- Webster, L.J. (1995) Total fat analysis: SFE is setting the standard. *World of Ingredients* **5**, 46.
- Weidner, E., Zhang, Z., Czech, B., Peter, S. (1993) Deoiling of crude lecithin with propane. *Fett Wissenschaft und Technologie* **95**, 347.
- Wicker, L., Temelli, F. (1988) Heat inactivation of pectinesterase in orange juice pulp. *J. Food Sci.* **53**, 162.
- Worthington, R.E., Hitchcock, H.L. (1984) A method for the separation of seed oil steryl esters and free esterols: application to peanut and corn oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**, 1085.
- Wright, J.L.C., McInnes, A.G., Shimizu, S., Smith, D.G., Walter, J.A. (1978) Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance espectroscopy. *Can. J. Chem.* **56**, 1898.

- Wright, B.W., Wright, C.W., Gale, R.W., Smith, R.D. (1987) Analytical supercritical fluid extraction of adsorbent materials. *Anal. Chem.* **59**, 38.
- Wu, Y.V., Friedrich, J.P., Warner, K. (1990) Evaluation of corn distillers' dried grains defatted with supercritical carbon dioxide. *Cereal Chem.* **67**, 585.
- Wu, Y.V., King, J.W., Warner, K. (1994) Evaluation of corn gluten meal extracted with supercritical carbon dioxide and other solvents: flavor and composition. *Cereal Chem.* **71**, 217.
- Yamaguchi, K., Murakami, M., Nakano, H., Konosu, S., Kokura, T., Yamamoto, H., Kosaka, M., Hata, K. (1986) Supercritical carbon dioxide extraction of oils from Antarctic krills. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 904.
- Yener, S.M. (1989) Milk production from goats. *Le lait dans la région méditerranéenne. Options méditerranéennes*. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes (CIHEAM) série séminaires **6**, 149.
- Yu, Z.R., Rizvi, S.S.H., Zollweg, J.A. (1992) Fluid-liquid equilibria of anhydrous milk fat with supercritical carbon dioxide. *J. Supercritical Fluids* **5**, 123.
- Zadow, J.G., (1988) Fermentation of whey and permeate. *Bull. Int. Dairy Fed.* **233**, 53.
- Zamora, R., Navarro, J.L., Hidalgo, F.J. (1994) Identification and classification of olive oils by high-resolution  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**, 361.
- Zemel, G.P. (1989) Low pH inactivation of polyphenoloxidase. M. Sc Tesis. Universidad de Florida, Gainesville, Estados Unidos.
- Zhao, W., Shishikura, A., Fujimoto, A., Arai, K., Saito, S. (1987) Fractional extraction of rice bran oil with supercritical carbon dioxide. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1773.
- Zosel, K. (1978) Method for removing caffeine from coffee. Patente alemana 2.732.103.

ANEXO I

```

10 CLS : REM*****random gradiente e isocratico primeros*****
20 OPTION BASE 1
30 N = 30: INPUT "NUMERO Y NOMBRE DE LA FRACCION"; X, X$
40 DIM A$(N), D(N, 2), AGT(N), CONC(N, 2), F(N), PAG(N)
50 PRINT " - INDICA EL AREA DE LOS SIGUIENTES ACIDOS GRASOS"
60 PRINT "EN NUMERO DE CUENTAS"
70 FOR I = 1 TO N: READ A$(I), D(I, 1), D(I, 2)
80 PRINT A$(I), D(I, 1), D(I, 2): INPUT "AREA"; AGT(I)
85 NEXT I
92 CLS : Y = X * 40 / 60 + 13 + 1 / 3
93 INPUT "AREA DEL PATRON INTERNO EN NUMERO DE CUENTAS"; API
94 INPUT "CONCENTRACION DE PATRON INTERNO"; CPI
95 ECNmin = (LOG((Y - 2.8297) / 2.8297) / LOG(10) + .81143 - .0289) / .06025
96 ECNmax = (LOG((Y - 2.8297 + 2 / 3) / 2.8297) / LOG(10) + .81143 + .0289) / .06025
109 FOR I = 1 TO N
110 IF I = 1 THEN F(I) = .238: GOTO 118
111 IF I = 2 THEN F(I) = .476: GOTO 118
112 IF I = 3 THEN F(I) = .623: GOTO 118
113 IF I = 23 THEN F(I) = .914: GOTO 117
114 IF I = 25 THEN F(I) = .868: GOTO 117
115 IF I = 27 THEN F(I) = .87 ELSE F(I) = 1
117 IF I = 23 OR I = 25 OR I = 27 THEN CONC(I, 1) = AGT(I) * CONC(15, 1) / (AGT(15) *
F(I)): GOTO 119
118 CONC(I, 1) = AGT(I) * CPI / (API * F(I))
119 NEXT I
140 CLS
150 FOR I = 1 TO N
155 FOR J = I TO N
160 FOR I0 = J TO N
163 TRGO(1) = D(I, 1) + D(J, 1) + D(I0, 1): TRGO(2) = D(I, 2) + D(J, 2) + D(I0, 2)
165 ECN = TRGO(1) - 2.12448 * TRGO(2)
170 IF ECN > ECNmin AND ECN < ECNmax THEN CONC(I, 2) = CONC(I, 1): CONC(J, 2) =
CONC(J, 1): CONC(I0, 2) = CONC(I0, 1)
175 NEXT I0
180 NEXT J
181 NEXT I
182 Z$ = "B:\F\" + X$: OPEN "O", #1, Z$
183 FOR I = 1 TO N: WRITE #1, A$(I), D(I, 1), D(I, 2), AGT(I), CONC(I, 1), CONC(I, 2),
F(I): NEXT I
184 WRITE #1, API, CPI
185 CLOSE 1
210 TCONC = 0
220 FOR I = 1 TO N: TCONC = TCONC + CONC(I, 2): NEXT I
230 FOR I = 1 TO N: PAG(I) = (CONC(I, 2) / TCONC) * 100
240 NEXT I
241 LPRINT "      FRACCION"; X; "      ELUCION A LOS"; Y; "MINUTOS"

```

```

242 LPRINT "    ECNm;n="; ECNmin; "    ECNm x="; ECNmax
243 LPRINT "AREA DE PATRON INTERNO: "; API; "  CONCENTRACION DE PATRON
INTERNO: "; CPI
250 LPRINT : LPRINT "TRIGLICERIDO"; TAB(33); "NC"; TAB(39); "DE"; TAB(46);
"ECN"; TAB(57); "%"; : LPRINT
260 FOR I = 1 TO N
270 FOR J = I TO N
280 FOR IO = J TO N
290 TRG$ = A$(I) + A$(J) + A$(IO)
320 IF J <> I THEN 360
330 IF IO = J THEN RES = (PAG(I) * PAG(J) * PAG(IO)) / (10000) ELSE RES = (PAG(I) *
PAG(J) * PAG(IO) * 3) / (10000): GOTO 370
360 IF IO = J THEN RES = (PAG(I) * PAG(J) * PAG(IO) * 3) / (10000) ELSE RES = (PAG(I)
* PAG(J) * PAG(IO) * 6) / (10000)
370 IF RES < .1 THEN 410
375 ECN = (D(I, 1) + D(J, 1) + D(IO, 1)) - 2.12448 * (D(I, 2) + D(J, 2) + D(IO, 2))
380 IF ECN < ECNmin OR ECN > ECNmax THEN 410
400 LPRINT TAB(4); TRG$; TAB(32); TRGO(1); TAB(39); TRGO(2); TAB(45); ECN;
TAB(55); RES
410 NEXT IO
420 NEXT J
430 NEXT I
440 DATA "C4:0 ",4,0,"C6:0 ",6,0,"C8:0 ",8,0,"C10:0 ",10,0,"C10:1 ",10,1,"C12:0 ",12,0
450 DATA "C13:0 ",13,0,"C14:0 ",14,0,"C14:1 ",14,1,"i-C15:0 ",15,0,"ai-C15:0 ",15,0,"C15:0
",15,0
460 DATA "C15:1 ",15,1,"i-C16:0 ",16,0,"C16:0 ",16,0,"C16:1 ",16,1,"C16:1(Pa) ",16,1,"i-
C17:0 ",17,0
470 DATA "ai-C17:0 ",17,0,"C17:0 ",17,0,"C17:1 ",17,1,"C18:0 ",18,0,"C18:1(O) ",18,1
480 DATA "C18:1(V) ",18,1,"C18:2(L) ",18,2,"C19:0 ",19,0,"C18:3(Ln) ",18,3
490 DATA "ctcC18:2 ",18,2,"C20:0 ",20,0,"C20:1 ",20,1
700 END

```



## ANEXO II

```

10 CLS
20 OPTION BASE 1
30 N = 30: INPUT "NUMERO Y NOMBRE DE LA FRACCION", X, XS
40 DIM A$(N), D(N, 2), AGT(N), CONC(N, 2), F(N), PAG(N)
50 PRINT " - INDICA EL AREA DE LOS SIGUIENTES ACIDOS GRASOS"
60 PRINT "EN NUMERO DE CUENTAS"
70 FOR I = 1 TO N: READ A$(I), D(I, 1), D(I, 2)
80 PRINT A$(I), D(I, 1), D(I, 2): INPUT "AREA"; AGT(I)
85 NEXT I
92 CLS : Y = X * 40 / 60 + 13 + 1 / 3
93 INPUT "AREA DEL PATRON INTERNO EN NUMERO DE CUENTAS", API
94 INPUT "CONCENTRACION DE PATRON INTERNO", CPI
95 ECNmin = (LOG((Y - 2.8297) / 2.8297) / LOG(10) - .72093 - .0151) / .01919
96 ECNmax = (LOG((Y - 2.8297 + 2 / 3) / 2.8297) / LOG(10) - .72093 + .0151) / .01919
109 FOR I = 1 TO N
110 IF I = 1 THEN F(I) = .238: GOTO 118
111 IF I = 2 THEN F(I) = .476: GOTO 118
112 IF I = 3 THEN F(I) = .623: GOTO 118
113 IF I = 23 THEN F(I) = .914: GOTO 117
114 IF I = 25 THEN F(I) = .868: GOTO 117
115 IF I = 27 THEN F(I) = .87 ELSE F(I) = 1
117 IF I = 23 OR I = 25 OR I = 27 THEN CONC(I, 1) = AGT(I) * CONC(15, 1) / (AGT(15) *
F(I)): GOTO 119
118 CONC(I, 1) = AGT(I) * CPI / (API * F(I))
119 NEXT I
140 CLS
150 FOR I = 1 TO N
155 FOR J = 1 TO N
160 FOR IO = J TO N
165 ECN = (D(I, 1) + D(J, 1) + D(IO, 1)) - 2.14747 * (D(I, 2) + D(J, 2) + D(IO, 2))
170 IF ECN > ECNmin AND ECN < ECNmax THEN CONC(I, 2) = CONC(I, 1) * CONC(J, 2) =
CONC(J, 1) * CONC(IO, 2) = CONC(IO, 1)
175 NEXT IO
180 NEXT J
181 NEXT I
182 Z$ = "B:AF" + XS: OPEN "O", #1, Z$
183 FOR I = 1 TO N: WRITE #1, A$(I), D(I, 1), D(I, 2), AGT(I), CONC(I, 1), CONC(I, 2),
F(I): NEXT I
184 WRITE #1, API, CPI
185 CLOSE #1
210 TCONC = 0
220 FOR I = 1 TO N: TCONC = TCONC + CONC(I, 2): NEXT I
230 FOR I = 1 TO N: PAG(I) = (CONC(I, 2) / TCONC) * 100
240 NEXT I
241 LPRINT "      FRACCION", X, "      ELUCION A LOS", Y, "MINUTOS"
242 LPRINT "      ECNmín=", ECNmin, "      ECNmáx=", ECNmax

```

```

243 LPRINT "AREA DE PATRON INTERNO: "; API; "  CONCENTRACION DE PATRON
INTERNO: "; CPI
250 LPRINT : LPRINT "TRIGLICERIDO"; TAB(33); "NC"; TAB(39); "DE"; TAB(46);
"ECN"; TAB(57); "%"; : LPRINT
260 FOR I = 1 TO N
270 FOR J = I TO N
280 FOR IO = J TO N
290 TRG$ = A$(I) + A$(J) + A$(IO)
320 IF J <> I THEN 360
330 IF IO = J THEN RES = (PAG(I) * PAG(J) * PAG(IO)) / (10000) ELSE RES = (PAG(I) *
PAG(J) * PAG(IO) * 3) / (10000): GOTO 370
360 IF IO = J THEN RES = (PAG(I) * PAG(J) * PAG(IO) * 3) / (10000) ELSE RES = (PAG(I)
* PAG(J) * PAG(IO) * 6) / (10000)
370 IF RES < .1 THEN 410
375 ECN = (D(I, 1) + D(J, 1) + D(IO, 1)) - 2.14747 * (D(I, 2) + D(J, 2) + D(IO, 2))
380 IF ECN < ECNmin OR ECN > ECNmax THEN 410
390 TRGO(1) = D(I, 1) + D(J, 1) + D(IO, 1): TRGO(2) = D(I, 2) + D(J, 2) + D(IO, 2)
400 LPRINT TAB(4); TRG$; TAB(32); TRGO(1); TAB(39); TRGO(2); TAB(45); ECN;
TAB(55); RES
410 NEXT IO
420 NEXT J
430 NEXT I
440 DATA "C4:0 ",4,0,"C6:0 ",6,0,"C8:0 ",8,0,"C10:0 ",10,0,"C10:1 ",10,1,"C12:0 ",12,0
450 DATA "C13:0 ",13,0,"C14:0 ",14,0,"C14:1 ",14,1,"i-C15:0 ",15,0,"ai-C15:0 ",15,0,"C15:0
",15,0
460 DATA "C15:1 ",15,1,"i-C16:0 ",16,0,"C16:0 ",16,0,"C16:1 ",16,1,"C16:1(Pa) ",16,1,"i-
C17:0 ",17,0
470 DATA "ai-C17:0 ",17,0,"C17:0 ",17,0,"C17:1 ",17,1,"C18:0 ",18,0,"C18:1(O) ",18,1
480 DATA "C18:1(V) ",18,1,"C18:2(L) ",18,2,"C19:0 ",19,0,"C18:3(Ln) ",18,3
490 DATA "ctcC18:2 ",18,2,"C20:0 ",20,0,"C20:1 ",20,1
700 END

```